

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr.med. Hans H e r k e n

Untersuchungen zur intracellulären Verteilung
von Lipiden nach Einwirkung verschiedener Pharmaka

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Lona Gaßmann geb. Neke
aus Berlin

1968

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr.med. Hans H e r k e n

Untersuchungen zur intracellulären Verteilung
von Lipiden nach Einwirkung verschiedener Pharmaka

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Lona Gaßmann geb. Neke
aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang S p i e r

Referent: Professor Dr. med. Diether N e u b e r t

Korreferent: Professor Dr. med. Hans H e r k e n



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am 20. Juni 1968

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DISPOSITION

=====

	<u>Seite</u>
<u>E I N L E I T U N G</u>	1
<u>M E T H O D I K</u>	5
I. Vorbehandlung der Versuchstiere	5
Versuch I (N-Methyl-N-Nitrosourethan)	5
Versuch II (Chlortetracyclin)	6
Versuch III (6-Aminonicotinamid)	6
Versuch IV (Phenyldiallylessigsäure- diäthylaminoäthanolester (CFT 1201))	6
Versuch V (2,4-Dinitrophenol)	8
Versuch VI (Fettinfusion)	8
Versuch VII (Hunger und Fettinfusion)	9
Versuch VIII (Penicillium rubrum)	9
Versuch IX (Halothan)	9
Versuch X (2/3 Hepatektomie)	10
II. Präparation der Lebern	10
1. Präparation der Zellfraktionen	10
2. Biochemische Methoden	13
a. N-Bestimmung	13
b. Bestimmung des Anteils der Phosphatide am Gesamtfett	13
c. Präparation der Lösungsmittel	13
d. Isolierung der Lipide aus den Zellfraktionen	14
α . Prinzip	14
β . Modifikation	15
3. Lipidgehalt in den Zellfraktionen der Kontrolltiere	18
4. Die intracelluläre Verteilung der Lipide	22

	<u>Seite</u>
<u>ERGEBNISSE</u>	24
Versuch I	24
Versuch II	31
Versuch III	34
Versuch IV	37
Versuch V	43
Versuch VI	46
Versuch VII	56
Versuch VIII	61
Versuch IX	64
Versuch X	66
Zusammenfassung der Versuchsergebnisse	73
<u>DISKUSSION</u>	78
a. Schädigung des endoplasmatischen Retikulums	80
b. Hemmung der Proteinsynthese	82
c. Hemmung der Phosphatidsynthese	84
d. Hemmung der Cholesterinsynthese	85
e. Hemmung des Energiestoffwechsels	88
f. Lipiderhöhung in der Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion	90
<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	93

E i n l e i t u n g

Die außerordentliche Vielfalt der Noxen, von denen bekannt ist, daß sie eine "Leberverfettung" herbeiführen können, spricht für eine relativ unspezifische Antwort der Leber auf Schädigungen. Dies zeigt ein kurzer Überblick über einige Ursachen einer Leberverfettung:

Gifte

Hunger, Mangel an lipotropen Substanzen

Hepatektomie

O₂-Mangel

Infektionen

Hormone

Der Begriff "Leberverfettung" kann sowohl biochemisch als auch morphologisch definiert werden. Biochemisch ist der Fettanteil nach einer Extraktion genau bestimmbar. Ein Fettgehalt bis zu 4% des Leberfeuchtgewichtes gilt als normal (LETTERER, 1959); darüber liegende Werte, die 60% des Leberfeuchtgewichtes erreichen können, sind Ausdruck einer Leberverfettung.

Als Zeichen einer Verfettung gilt pathologisch-anatomisch das vermehrte Auftreten von Fett in Form von histologisch nachweisbaren intracellu-

lären Fettröpfchen. LETTERER (1959) unterscheidet vier große Gruppen der Leberverfettung: fleckförmig unregelmäßig, azinoperipher, azinozentral und diffus; diesen Untergruppen ordnet er die verschiedenen Ursachen zu, wie z.B. Hunger dem azinoperipheren Verfettungstyp. Über die unterschiedlichen biochemischen Genesen sagt diese empirisch gefundene Unterteilung zwar nichts aus, weist aber darauf hin, daß eine "Leberverfettung" bereits morphologisch nicht als einheitliches Bild in Erscheinung tritt.

Zusammenwirkend mit den Stoffwechselvorgängen des peripheren Fettgewebes ist die Leber ein zentrales Organ im Fettstoffwechsel. Ihr Fettgehalt steht mit dem der Fettdepots, mit den Plasmalipoproteiden und der alimentären Fettzufuhr in Beziehung, ferner mit dem Kohlehydrat- und Eiweißstoffwechsel. Störungen, die den Fettgehalt der Leber beeinflussen, können demnach ganz verschiedene Angriffspunkte haben.

Voraussetzung eines jeden Versuchs, pathologische Veränderungen des Fettstoffwechsels zu deuten, wäre die genaue Kenntnis des Fettstoffwechsels und seiner Regulation. Zwar sind in den letzten Jahren die Synthese- und Abbauege der Fettsäuren, Triglyceride,

Phosphatide und Sterine durch Arbeiten von LYNEN, BLOCH, KENNEDY u.a. (z.B. KENNEDY, 1957) weitgehend aufgeklärt worden, über die quantitativen Beziehungen und die Regulationsvorgänge im Fettstoffwechsel herrschen jedoch noch recht unklare Vorstellungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Substanzen und Zustände untersucht, die die drei ersten Gruppen der oben angegebenen möglichen Ursachen einer Leberverfettung darstellen. Einige der verwendeten Pharmaka und Maßnahmen greifen nicht direkt in den Fettstoffwechsel ein. Die Frage, inwieweit sie diesen sekundär schädigen können, war ein Hauptanliegen der folgenden Untersuchungen.

Zusätzlich interessierte die intracelluläre Verteilung des pathologisch aufgetretenen Leberfetts. Es ist seit langem bekannt, daß sich das Fett hauptsächlich im Hyaloplasma ansammelt. Die Untersuchungen von NEUBERT und HOFFMEISTER (1960) lieferten Hinweise dafür, daß unter bestimmten Phenyllessigsäure-Derivaten und den seltenen Erden (La, Pr und Nd) prinzipiell auch Mitochondrien und Mikrosomen "verfetten" können. Dies wurde im Rahmen der im folgenden beschriebenen experimentellen Verfettungen auch in anderen Fällen gefunden.

Außerdem wurde der Frage nachgegangen, in welchem Maße die Phospholipide an einer Zunahme des Gesamtfetts beteiligt sein können. Die Meinung HARTMANN und FLECK (1952), eine Leberverfettung sei immer auf eine Zunahme von Neutralfetten und eine Abnahme der Phosphatide zurückzuführen, ist bereits von NEUBERT und HOFFMEISTER widerlegt worden. Auch die vorliegende Arbeit zeigt, daß bei einer Verfettung der Leberzelle der Gehalt an Phospholipoiden konstant bleibt oder sogar zunehmen kann.

Das große Interesse, das der Leberverfettung entgegengebracht wird, beruht nicht nur auf dem oben angedeuteten komplexen biochemischen Geschehen, sondern auch auf dem klinisch gefürchteten möglichen Übergang einer Fettleber in eine Cirrhose.

M e t h o d i k

=====

I. Vorbehandlung der Versuchstiere

Die Versuche wurden an ca. 350 Albino-Ratten durchgeführt; lediglich bei der Applikation von Halothan wurden weiße Mäuse verwandt, weil diese Spezies gegen halogenierte Kohlenwasserstoffe empfindlicher ist (SCHIMASSEK, KUNZ, GALLWITZ, 1965). Die Untersuchungen wurden an weiblichen Tieren vorgenommen, da sie auf Stoffe mit Leber verfettender Wirkung ausgeprägter reagieren (MAIBAUER, NEUBERT, ROTTKA, 1958). Es wurden Tiere verschiedener Tierzüchter benutzt.

Die Tiere erhielten Wasser ad libitum. Soweit bei der Beschreibung der Versuche nichts anderes vermerkt ist, wurde das Standardfutter Altromin R gegeben.

Die Dosen der applizierten Pharmaka lagen meist sehr hoch, um möglichst deutliche Effekte zu erzielen.

Es wurden gegeben:

Versuch I: N-Methyl-N-Nitrosourethan.

A. Einmalige Applikation. Die 140 - 150 g schweren Tiere erhielten 120 mg/kg oral mit Schlundsonde.

Untersuchungen der Lebern nach 16 Stdn.

B. Dreimalige Applikation. Den 140 - 150 g schweren Tieren wurde 120 mg/kg, nach 3 Tagen 60 mg/kg, nach

weiteren 3 Tagen 60 mg/kg gegeben. Am 2. Tag nach Verabreichung der ersten Dosis starb 1 Tier. Die übrigen 15 behandelten Tiere wiesen bei der Laparotomie, die 16 - 18 Stdn. nach Applikation der letzten Dosis vorgenommen wurde, Blutungen der Magenwand auf.

C. Chronische Applikation. 10 Ratten erhielten für die Dauer von 4 Wochen ca. 20 - 30 mg/kg/die im Trinkwasser. Bei 3 Tieren waren die Lebern an der Oberfläche grob gehöckert, bei den anderen fein granuliert bis normal. Sie ließen sich außerordentlich schwer homogenisieren.

Versuch II: Chlortetracyclin (Aureomycin). An 3 aufeinander folgenden Tagen je 100 mg/kg intraperitoneal. 40 Stdn. nach Applikation der letzten Dosis wurden die 170 - 200 g schweren Tiere getötet.

Versuch III: 6-Aminonicotinamid. 150 mg/kg i.p. 16 Stdn. vor Dekapitation der Tiere. 5 von 13 behandelten Tieren (130 - 140 g schwer) starben, die übrigen wiesen charakteristische Lähmungen der hinteren Extremitäten auf.

Versuch IV: Phenyldiallylessigsäure-diäthylamino-äthanolster (CFT 1201).

A. Applikation per os nach folgendem Schema:

<u>1. Tag</u>	<u>500 mg/kg</u>
<u>2. Tag</u>	<u>300 mg/kg</u>
<u>3. Tag</u>	<u>400 mg/kg</u>
<u>4. Tag</u>	<u>400 mg/kg</u>

In den ersten 24 Stdn. starben von den 16 ca.

130 g schweren Versuchstieren 3 Tiere; während der nächsten 3 Tage starb 1 Tier pro Tag. 18 Stdn. nach der letzten Gabe wurden die Lebern untersucht. Nur eine Leber erschien makroskopisch relativ stark verfettet, die übrigen wiesen bei dunkelblauroter Verfärbung eine vermehrte Läppchenzeichnung auf.

B. Dosierung nach folgender Tabelle:

<u>1. Tag</u>	<u>500 mg/kg</u>
<u>2. Tag</u>	<u>300 mg/kg</u>
<u>3. Tag</u>	<u>400 mg/kg</u>
<u>4. Tag</u>	<u>400 mg/kg</u>
<u>5. Tag</u>	<u>500 mg/kg oral</u>

Am ersten Tag starb 1 Tier von 15 ca. 120 g schweren Versuchstieren. Am 6. Tag Aufarbeitung der Lebern, die makroskopisch stark verfettet erschienen.

C. An 7 aufeinander folgenden Tagen erhielten die 150 - 170 g schweren Tiere 70 mg/kg/die oral durch die Schlundsonde, an den darauffolgenden 7 Tagen 150 mg/kg/die. Untersuchungen der Lebern 16 - 18 Stdn. nach Gabe der letzten Dosis. Makroskopisch erschienen die Lebern nur mäßig verfettet.

Versuch V: 2,4 Dinitrophenol. Orale Applikation

mit der Schlundsonde nach folgendem Schema:

<u>1. Tag</u>	<u>20 mg/kg</u>	<u>5. Tag</u>	<u>40 mg/kg</u>
<u>2. Tag</u>	<u>30 mg/kg</u>	<u>6. Tag</u>	<u>70 mg/kg</u>
<u>3. Tag</u>	<u>35 mg/kg</u>	<u>7. Tag</u>	<u>80 mg/kg</u>
<u>4. Tag</u>	<u>35 mg/kg</u>	<u>8. Tag</u>	<u>60 mg/kg</u>

Die Dosen wurden jeweils in 2, am 6. und 7. Tag in 3 Einzelgaben auf den Tag verteilt. Am 6. Tag starben 2 der 15 Versuchstiere. Während das durchschnittliche Gewicht der 10 Kontrolltiere von anfänglich 208 g auf 226 g am 9. Tag angestiegen war, zeigen die Vergleichszahlen - von 210 g auf 206 g - einen Wachstumsstillstand der behandelten Tiere.

Untersuchung der Lebern am 9. Tag.

Versuch VI: Intravenöse Gabe einer Fettemulsion

aus fraktioniertem Sojabohnenöl (20%), fraktioniertem Eigelblecithin (1,2%) in 2,5%iger Glycerinlösung (Intralipid 20%, Vitrum).

A. Den 100 g schweren Tieren wurden 45 ml/kg Intralipid in eine Schwanzvene injiziert. 15 Stdn. später Untersuchung der Lebern.

B. 75 ml/kg Intralipid wurden den 160 g schweren Tieren mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 5 ml/Std. in eine Schwanzvene infundiert. Bis zur Präparation der sehr stark verfetteten Lebern 12 - 14 Stdn. nach Ende der Infusion starben 3 von 7 Versuchstieren.

Versuch VII: Hunger und Fettinfusion.

A. Die Tiere wurden nach einer 24stündigen Hungerperiode verwandt (Hunger-Kontrollen).

B. Einem Teil der 130 g schweren Tiere der Gruppe A wurden 10 Stdn. nach Beginn der Hungerperiode 81 ml/kg Intralipid i.v. mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 5 ml/Std. gegeben. Bis zur Untersuchung der stark verfetteten Lebern am Ende der Versuchszeit (insgesamt 24 Stdn.) starb von 7 Versuchstieren 1 Tier.

Versuch VIII: Toxin aus Penicillium rubrum (gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung, die mit Na_2CO_3 auf pH 8 - 9 eingestellt war). 11 ca. 130 g schwere Tiere erhielten 8 mg/kg intraperitoneal, nach 24 Stdn. nochmals 12 mg/kg i.p. 4 Todesfälle in den 16 Stdn. zwischen der 2. Applikation von Penicillium rubrum und der Aufarbeitung der Lebern.

Versuch IX: Halothan. 19 weiße Mäuse inhalierten an 5 Tagen in einem geschlossenen System 2 x pro Tag (am 3. Tag 1x) je 1 Std. lang ca. 1% Halothan. Nach einem kurzen Exzitationsstadium fielen die Mäuse in Narkose, die sich an frischer Luft wieder über ein Exzitationsstadium löste. In dem beobachteten Zeitraum starb kein Tier. Das Durchschnittsgewicht der Mäuse von 24,9 g änderte sich durch die Gaben von

Halothan nicht. Am 6. Tag erfolgte die Untersuchung der Lebern.

Versuch X: 2/3 Hepatektomie.

A. 4 Ratten (ca. 340 g schwer) wurden in Äthernarkose die beiden großen Leberlappen herausoperiert. Das Peritoneum wurde anschließend genäht, das Fell geklammert. Bis zur Untersuchung der Lebern nach 36 Stdn. erhielten die Tiere kein Futter. Die verbleibenden kleinen Leberlappen waren hypertrophiert und massiv verfettet.

B₁. Hepatektomie an 9 ca. 220 g schweren Tieren.

Während des 1. Tages nach der Operation Nahrungsentzug.

B₂. Hepatektomie an 7 Tieren desselben Gewichts.

Nahrungskarenz in den folgenden 24 Stdn. Die Tiere der Gruppe B₁ wurden nach 41 Stdn. untersucht, die Tiere der Gruppe B₂ nach 65 Stdn. Hypertrophie und nach 41 Stdn. sehr starke Verfettung der kleinen Leberlappen.

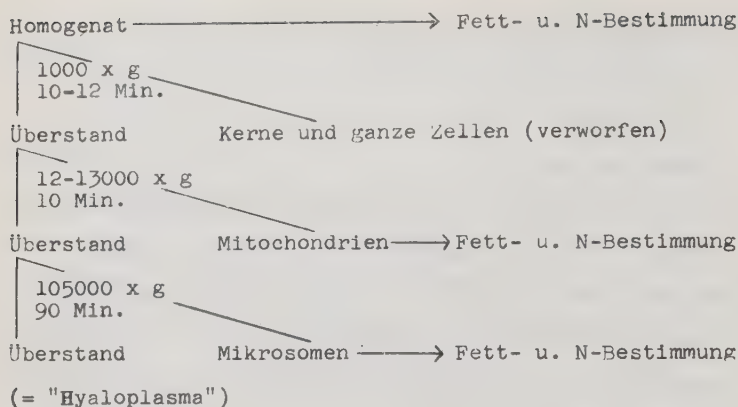
II. Präparation der Lebern

1. Präparation der Zellfraktionen

Prinzipiell wurde mit jeder behandelten Tiergruppe gleichzeitig eine Kontrollgruppe untersucht. In je-

dem Versuch wurde der Fettgehalt des Homogenats, der Mitochondrien und der Mikrosomen der pathologischen Lebern sowie der entsprechenden Kontrolllebern bestimmt.

Die Tiere wurden im Kühlraum ($2 - 4^{\circ}\text{C}$) dekapitiert. Nach dem Ausbluten wurden die Lebern schnell herauspräpariert. Pro Versuch wurde je nach Gewicht der Tiere jedesmal ein Durchschnittswert von 4 - 9 Tieren bestimmt. Im Plexiglasgerät nach POTTER und ELVEHJEM (1936) wurden die Lebern in isotoner, auf $+ 4^{\circ}\text{C}$ abgekühlter Saccharoselösung (0,25 M) homogenisiert. Zugabe von Tris-HCl-Puffer (0,02 M Endkonz.) und/oder EDTA (0,5mM Endkonz.) beeinflusste die Ergebnisse nicht. Das gewonnene Homogenat wurde mit Saccharoselösung auf ca. 200 ml aufgefüllt. Wenige ml dieser Menge dienten zur Fettbestimmung und N-Bestimmung im Homogenat. In der Phywe-Eispirouette wurden bei $1000 \times g$ (10 - 12 Min.) Kerne und ganze Zellen abgetrennt. Das Sediment wurde verworfen; aus dem Überstand wurde bei $12 - 13000 \times g$ (10 Min.) in der Phywe-Weickhoff-Zentrifuge die Mitochondrienfraktion gewonnen. Der jetzt erhaltene Überstand lieferte bei $105000 \times g$ (90 Min.) in der Spinco Ultrazentrifuge L 50 die Mikrosomenfraktion. Den Verlauf der Zellfraktionierung veranschaulicht folgendes Schema:



Bereits bei Zentrifugation der Kontrollebern, besonders aber der experimentell verfetteten Lebern "rahmte" sich Fett als mehr oder weniger dicke, weiße Schicht über dem Überstand auf. Deshalb wurden die Sedimente mehrmals wieder in Saccharoselösung suspendiert und anschließend abzentrifugiert. Auf diese Weise wurden die Mitochondrien 3x, bei sehr starker Leberverfettung 4 x bis zum Klarbleiben des Überstandes "gewaschen". Die Mikrosomen wurden 1 x gewaschen.

Daß ein erhöhter Fettgehalt der Mitochondrien und Mikrosomen nicht etwa auf Verunreinigung mit Fett aus dem Hyaloplasma durch ungenügenden Wascheffekt zurückzuführen ist, zeigt ein Vergleich der Fettanstiege der Homogenate mit denen der entsprechenden Mitochondrien und Mikrosomen (Abb. 12 - 14). Die höch-

sten Werte der Homogenate fallen durchaus nicht mit den Maximalwerten der dazugehörigen Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionen zusammen.

Mitochondrien und Mikrosomen wurden in einigen ml Saccharoselösung aufgenommen. Diese Suspensionen dienten zur Fettextraktion und N-Bestimmung.

2. Biochemische Methoden

a. N-Bestimmung. Das organische Substrat wurde mit konzentrierter H_2SO_4 unter Zusatz von Se-Katalysator verascht und der N-Gehalt nach KJELDAHL ermittelt.

b. Bestimmung des Anteils der Phosphatide am Gesamtfett. Ein Teil des extrahierten Fettes wurde mit 12 n Perchlorsäure verascht und der Phosphatgehalt nach BEERENBLUM und CHAIN (1938) bestimmt. Durch Multiplikation der gefundenen P-Menge mit dem Faktor 23 (ARTOM und FISHMAN, 1943) wurde der Gehalt an Phosphatiden kalkuliert.

c. Präparation der Lösungsmittel. Peroxydfreier Äther wurde durch Ausschütteln mit NaOH-Rotuli (15 Min.) und anschließender Destillation gewonnen. Zur Herstellung von absolut wasserfreiem Chloroform wurde handelsübliches Chloroform mit P_2O_5 15 Min.

zum Sieden erhitzt und nachfolgend destilliert.

d. Isolierung der Lipide aus den Zellfraktionen.

Unter Gesamtfetten (= Lipiden) ist die durch organische Lösungsmittel (z.B. Äther, Chloroform) oder Gemische (Chloroform/Methanol) extrahierbare Substanz zu verstehen. Sie enthält in wechselnder Zusammensetzung:

Neutralfette,

Phospholipoide,

Cholesterin und Cholesterinester,

(Glykolipoide),

(Proteolipoide).

α) Prinzip.

Die Extraktion des Gesamtfetts erfolgte nach einer Modifikation des bei FOLCH et al. (1957) angegebenen 2-Phasen-Systems. Es handelt sich dabei um

folgendes Prinzip: Ein Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser trennt sich spontan in 2 Phasen.

Die obere Phase enthält das Wasser und den größten Teil des Methanols neben einer Spur Chloroform, die untere Phase besteht aus dem Chloroform, einer sehr geringen Menge Methanol und einer Spur Wasser. Wird nun in dem Gemisch Chloroform/Methanol-Wasser das Wasser durch eine Gewebe-Suspension ersetzt, so geht der größte Teil des darin enthaltenen Fettes

in die organische Phase über. Die obere Phase enthält lediglich die mehr polaren Bestandteile: Glykolipoide und Proteolipoide. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit nicht oder nur zum Teil erfaßt, da nur die organische Phase aufgearbeitet wurde. Ohnehin ist ihr Anteil am Gesamtfett der Leber gering.

β) Modifikation.

Im Rahmen der folgenden Untersuchungen erwies sich das Gemisch Chloroform/Methanol-Gewebe-Suspension als ungünstig. Wegen der hohen Dichte des Chloroforms war keine vollständige Sedimentation der Zellpartikel zu erreichen. Ersatz des Chloroforms durch Äther verbesserte die Sedimentation. Auf Grund seines leichteren spezifischen Gewichts trennte sich der Äther als obere Phase ab, was die Entnahme der fetthaltigen Phase vereinfachte. In einem Vorversuch wurde parallel-
laufend mit Äther, mit Chloroform/Methanol und mit Äther/Methanol extrahiert. Zu je 3,5 ml einer Mitochondriensuspension normaler Lebern wurden zugesetzt: 9 ml Äther (Versuch 1), 6 ml Chloroform + 3 ml Methanol (Versuch 2), 6 ml Äther + 3 ml Methanol (Versuch 3). Die Weiterbehandlung entsprach dem weiter unten angegebenen Extraktionsverlauf (bei Versuch 2 wurde mit Chloroform weiter extrahiert). Die Ergebnisse sind in Tab. 1 wiedergegeben.

Tabelle 1

Vorversuch: Vergleich der mit verschiedenen organischen
Lösungsmitteln extrahierten Fettmengen

Lösungs- mittel	1. Extrak- tion	2. Extrak- tion	3. Extrak- tion	Gesamtmenge an extrah. Fett
Äther	22,9 mg	3,8 mg	2,8 mg	29,5 mg
Chloroform/ Methanol	20,6 mg	11,6 mg	2,2 mg	34,4 mg
Äther/ Methanol	34,4 mg	6,1 mg	1,6 mg	42,1 mg

Versuchsbedingungen s. unter Methodik II, 2

Der quantitative Vergleich zeigt, daß die niedrigste Lipidmenge durch Äther ohne Zusatz, die höchste durch das Lösungsgemisch Äther/Methanol gewonnen wurde. Es ist anzunehmen, daß die Zusammensetzung dieses Extraktes durch die geringere Polarität des Äthers geringfügig gegenüber dem des Versuchs 2 verändert wurde. Die Art des verwendeten Äthers - normal oder peroxydfrei - änderte am quantitativen Ergebnis der Extraktionen nichts.

Die Fette wurden in Schliff-Zentrifugenröhrchen aus den Gewebesuspensionen extrahiert. Zu je 3,5 ml des Homogenats bzw. der Mitochondrien- oder Mikrosomenfraktion wurden 6 ml Äther und 3 ml Methanol gegeben. (Bei Erhöhung des Methanolgehalts von 3 auf 4 Volumina blieb die gewünschte Trennung in 2 Phasen bereits aus.) Die Zentrifugengläser wurden 24 - 48 Stunden im Kälteraum geschüttelt. Nach Zentrifugation in der Laborzentrifuge (2 - 4 Min.) wurde die Äther-Schicht abgehebert. Es folgten 3 weitere 24 - 48stündige Extraktionen mit je 6 ml Äther. Wie aus Tab. 1 ersichtlich, enthielt die zuerst gewonnene Fettextraktion die größte Fettmenge; aber auch die zweite Extraktion lieferte einen beachtlichen Anteil. Auf die vierte Extraktion wurde beim Vorversuch verzichtet. Die vereinigten Extrakte wurden im Vakuum vorsichtig eingedampft und im Exsiccator getrocknet. Danach wurden die Fette in

absolut wasserfreiem Chloroform aufgenommen und filtriert, um Verunreinigungen durch wasserlösliche Substanzen auszuschließen. Die Filter wurden mit 3 x 5 ml Chloroform nachgewaschen. Die Filtrate wurden im Exsiccator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und die Lipide gravimetrisch bestimmt. Der gewogene Extrakt enthielt demnach folgende Bestandteile: Neutralfette, Phospholipide, Cholesterin und Cholesterinester. Der Anteil der Phospholipide am Gesamtfett wurde zusätzlich bestimmt. Bezugssystem sowohl für das Gesamtfett als auch für die Phosphatide war der Stickstoffgehalt der entsprechenden Suspensionen.

3. Lipidgehalt in den Zellfraktionen der Kontrolltiere.

Ein Vergleich des Gesamtfettgehalts bei Kontrolltieren aller Versuche (Tab. 2), die sich über einen Zeitraum von anderthalb Jahren erstreckten, ergibt drei Gruppen, die besonders in der Mitochondrienfraktion recht erheblich voneinander abweichen. Die niedrigsten Werte weist die erste Gruppe (Versuch I und II) auf. Es folgt die nächste, größte Gruppe (Versuche III bis X A) mit deutlichen Zunahmen des Lipidgehaltes der Mitochondrien bei keiner signifikanten Erhöhung ($P = 0,05$) des Gesamtfettgehalts der Lebern. Die höchsten Werte weist die letzte Gruppe auf

(Versuch XB); hier ist der Lipidgehalt in allen untersuchten Fraktionen gegenüber den Kontrollgruppen I und II erhöht.

Es wurde verschiedenen möglichen Ursachen dieser Streuung nachgegangen, insbesondere der Frage, ob Modifikationen der Versuchsbedingungen irgendeinen Einfluß auf die Ergebnisse nehmen können. Folgende Änderungen wurden vorgenommen:

1. Zugabe von Trispuffer und/oder EDTA zur Saccharoselösung, in der die Lebern aufbereitet wurden;
2. Senken der Beschleunigungen von 1000 x g auf 800 x g in der Phywe-Eispirouette und von 12000 x g auf 11500 x g in der Phywe-Weichhoff, um eine Selektion von Zellpartikeln in den entsprechenden Präparationen bei Benutzung verschiedener Zentrifugen auszuschließen;
3. Extraktion der Fette mit normalem statt peroxyd-freiem Äther;
4. 24 bis 48 Stdn. längere Dauer der Schüttelextraktion.

Keine dieser Modifikationen konnte die Kontrollwerte verändern, so daß der Grund für den verschiedenen hohen Lipidgehalt nur bei den Versuchstieren selbst liegen kann. Ein Schwanken des Fettgehalts der Lebern wäre denkbar durch Änderung in der Auf-

zucht der Tiere (z.B. in Klima, Futter) oder gar durch Einwirken eines Insektizids beim Züchter. Bemerkenswert ist, daß die Abweichung nur die Werte der Gesamtlipide betrifft; die Menge der Phospholipide pro Fraktion blieb konstant. Der genaue Grund der Schwankungen in den Kontrollgruppen konnte trotz intensiver Nachforschungen nicht geklärt werden. Es wäre zu empfehlen, bei späteren ähnlichen Versuchen nur mit Inzuchttieren aus eigener Zucht zu experimentieren. Für die Beurteilung der Versuche unter pathologischen Bedingungen spielt der verschiedene Fettgehalt der drei Kontrollgruppen nur eine untergeordnete Rolle, da bei jeder Versuchsserie die Ergebnisse auf Kontrollen aus dem entsprechenden Tierkollektiv bezogen wurden.

Innerhalb der drei Kontrollgruppen (Tab. 2) wurden der jeweilige Mittelwert und die entsprechende Streuung (σ) errechnet. Die Versuchsergebnisse wurden prozentual auf diesen Mittelwert ihrer Kontrollgruppe bezogen.

Tabelle 2

Zusammenstellung der Kontrollwerte (mg Gesamtfette bzw. Phosphatide / mg Stickstoff) sämtlicher Versuche in 3 Gruppen

<u>Gruppe I</u>		<u>Homogenat</u>		<u>Mitochondrien</u>		<u>Mikrosomen</u>	
Versuch		Gesamt- fette	Phospha- tide	Gesamt- fette	Phospha- tide	Gesamt- fette	Phospha- tide
I	A	1,13	0,59	1,30	0,86	2,70	1,46
I	B	1,23	0,68	1,31	0,84	2,70	1,46
I	C	1,53	0,87	1,38	0,99	2,97	2,16
II		1,40	0,76	1,36	0,92	2,39	1,44
M		1,32	0,73	1,34	0,90	2,69	1,63
± σ		± 0,18	± 0,12	± 0,04	± 0,07	± 0,24	± 0,35

<u>Gruppe II</u>		<u>Homogenat</u>		<u>Mitochondrien</u>		<u>Mikrosomen</u>	
Versuch		Gesamt- fette	Phospha- tide	Gesamt- fette	Phospha- tide	Gesamt- fette	Phospha- tide
III		1,49	0,64	2,14	1,26	3,34	1,60
IV	A	1,31	0,79	1,97	1,26	2,93	1,70
IV	B	1,45	0,65	2,23	1,25	3,14	1,48
IV	C	1,52	0,48	2,25	1,27	3,48	2,02
V		1,72	0,81	2,48	1,41	3,50	2,20
VI	A	1,75	0,86	2,00	1,20	3,27	1,77
VI	B	1,40	0,73	1,95	1,15	2,91	1,57
VIII		1,61	0,74	2,12	1,23	2,98	1,54
X	A	2,17	0,74	2,07	0,87	3,86	1,62
M		1,60	0,72	2,13	1,22	3,27	1,72
± σ		± 0,29	± 0,11	± 0,17	± 0,12	± 0,32	± 0,24

<u>Gruppe III</u>		<u>Homogenat</u>		<u>Mitochondrien</u>		<u>Mikrosomen</u>	
Versuch		Gesamt- fette	Phospha- tide	Gesamt- fette	Phospha- tide	Gesamt- fette	Phospha- tide
X	B ₁	2,64	0,63	3,13	1,00	5,36	1,29
X	B ₂						

Versuch VII ist nicht aufgeführt, weil seine Kontrollen denen des Versuchs VI A entsprechen. Im Versuch IX wurden statt Ratten Mäuse verwendet.

4. Die intracelluläre Verteilung der Lipide

Da bei den Versuchen nur Homogenat, Mitochondrien und Mikrosomen direkt untersucht wurden, nicht aber das Hyaloplasma und die Kerne, wurden letztere Fraktionen indirekt bestimmt, um eine Vorstellung über die intracelluläre Verteilung der extrahierten Lipide geben zu können. Zunächst wurden wieder die drei Kontrollgruppen ausgewertet (Tab. 3). Die der Berechnung zugrunde gelegten Werte über die intracelluläre Verteilung des Stickstoffs wurden der Arbeit von R. HOEHNE (1966) entnommen. Wie aus Tab. 3 ersichtlich, enthalten die Mikrosomen mit ca. 50% das meiste Fett der Zelle. Es wurde die Annahme gemacht, daß die Kerne unter pathologischen Bedingungen praktisch nicht verfetten. Unter dieser Voraussetzung ist es möglich, auch den Lipidgehalt der Hyaloplasmafraktion zu kalkulieren.

Tabelle 3

Die intracelluläre Verteilung der Gesamtlipide unter den in dieser Arbeit angegebenen Normalbedingungen: Kontrollgruppen I - III

Gruppe I

	N	Gesamtfett/ mg N	Gesamtfett/ Fraktion	prozentuale Verteilung
Homogenat	100	1,32	132	100 %
Kerne	13		12	9,1 %
Mitochondrien	27	1,34	36	27,3 %
Mikrosomen	24	2,69	65	49,2 %
Hyaloplasma	36		19	14,4 %

Gruppe II

	N	Gesamtfett/ mg N	Gesamtfett/ Fraktion	prozentuale Verteilung
Homogenat	100	1,60	160	100 %
Kerne	13		11	6,9 %
Mitochondrien	27	2,13	57	35,4 %
Mikrosomen	24	3,27	79	49,5 %
Hyaloplasma	36		13	8,2 %

Gruppe III

	N	Gesamtfett/ mg N	Gesamtfett/ Fraktion	prozentuale Verteilung
Homogenat	100	2,64	264	100 %
Kerne	13		15	5,7 %
Mitochondrien	27	3,13	85	32,1 %
Mikrosomen	24	5,36	129	49,0 %
Hyaloplasma	36		35	13,2 %

N = intracelluläre Verteilung des Stickstoffs (übernommene Werte)

Gesamtfett / mg Stickstoff = gemessene Kontrollwerte (s. Tab. 2)

Gesamtfett / Fraktion = errechnete Werte unter der Annahme, daß
Kerne ihren Fettgehalt nicht wesentlich ändern

E r g e b n i s s e

Aus den in dieser Arbeit vorgelegten Befunden geht hervor, daß der Grad der nach Applikation verschiedener Substanzen beobachteten Leberverfettungen differiert. Auch die intracelluläre Verteilung der Lipide war durchaus verschieden. Im allgemeinen manifestierte sich die Leberverfettung am deutlichsten im Homogenat. Unter den Versuchsbedingungen erhöhte sich der Fettgehalt im Homogenat (Gesamtleber) um mehrere 100 Prozent. Dagegen halten Mitochondrien und Mikrosomen ihren Bestand an Gesamtlipiden in der Regel relativ konstant; die höchsten beobachteten Steigerungen betrugen etwa 50%.

N-Methyl-N-Nitrosourethan (Versuch I A - I C)

Nitrosamin-Derivate stellen Cancerogene dar, die heute ein erhebliches theoretisches Interesse gewonnen haben. Von DRUCKREY und Mitarb. (1962) konnten Tumoren in einer großen Zahl der Versuchstiere bereits nach einmaliger Applikation dieser Derivate erzielt werden. Darüber hinaus gelingt es, durch Modifikation der Substituenten Nitrosamine herzustellen, die eine ausgesprochene Organspezifität

besitzen. N-Methyl-N-Nitrosourethan und N-Nitrosomorpholin führen zu bevorzugter Schädigung der Leber (und auch des Magens).

In Voruntersuchungen haben wir gefunden, daß bei einmaliger Gabe einer hohen Dosis von N-Methyl-N-Nitrosourethan nach 15 bis 24 Stunden eine massive Leberverfettung auftritt.

Das Ausmaß der Verfettung geht aus den in Tab. 4 bis 6 zusammengestellten Resultaten hervor. Der Anstieg der Gesamtfette im Homogenat war nach einmaliger Applikation (Versuch I A, Tab. 4) größer als nach dreimaliger (Versuch I B, Tab. 5). Dagegen rief in der Mitochondrienfraktion erst eine Behandlung über drei Tage einen deutlichen Effekt hervor, nämlich 25% Fettzunahme gegenüber dem Mittelwert der Kontrollgruppe I. Keine Veränderung des Fettgehalts im Homogenat brachte die vierwöchige chronische Applikation (Versuch I C, Tab. 6). Dagegen ist unter diesen Versuchsbedingungen in den Mitochondrien und in den Mikrosomen ein erhöhter Lipidgehalt nachweisbar. Dies betrifft nicht nur die Gesamtlipide, sondern auch die Phosphatide. Makroskopisch stand bei diesen Lebern weniger die Verfettung als eine beginnende cirrhotische Umgestaltung im Vordergrund.

Während in den Tabellen 4 - 6 der Lipidgehalt / mg N angegeben ist, zeigt die Abb. 1 eine Aufschlüsselung der Lipide auf die einzelnen Fraktionen der Zelle. Auch hier ist ersichtlich, daß die Mitochondrienfraktion am deutlichsten im Versuch I B, die Mikrosomenfraktion am deutlichsten im Versuch I C reagierten. Zusätzlich zeigt sich, daß die Lipidvermehrung im Versuch I A hauptsächlich das Hyaloplasma betrifft (immer vorausgesetzt, daß die Kerne nur unwesentlich "verfetten" können).

Tabelle 4

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von N-Methyl-N-Nitrosourethan
 (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontrollen mg/mg N 1)	Nitrosamin mg/mg N	Mittelwert der Kontr.gruppe I $M \pm \sigma$	% Verän- derung gegenüb. M	2)
HOMOGENAT					
Gesamtfett	1,13	2,54	$1,32 \pm 0,18$	+ 93	S
Phosphatid	0,59	0,76	$0,73 \pm 0,12$	+ 4	Ø
MITOCHONDRIEN					
Gesamtfett	1,30	1,43	$1,34 \pm 0,04$	+ 7	(S)
Phosphatid	0,86	0,96	$0,90 \pm 0,07$	+ 7	Ø
MIKROSOMEN					
Gesamtfett	2,70	3,18	$2,69 \pm 0,24$	+ 18	S
Phosphatid	1,46	1,84	$1,63 \pm 0,35$	+ 13	Ø

Versuch Nr. I A

Kontrollen: Mittelwert aus 9 Tieren

Nitrosamin (120 mg/kg): Mittelwert aus 9 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

2) Unterschied signifikant: **S** = deutlicher Unterschied

(S) = geringgradig verändert

Ø = gegenüber Kontr. nicht verändert

Tabelle 5

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von N-Ethyl-N-Nitrosourethan
 (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontrollen mg/mg N 1)	Nitrosamin mg/mg N	Mittelwert der Kontr.gruppe I $\bar{M} \pm \sigma$	% Verän- derung gegenüb. M	2)
HOMOGENAT					
Gesamt fett	1,23	1,81	$1,32 \pm 0,18$	+ 37	S
Phosphatid	0,68	0,74	$0,73 \pm 0,12$	+ 1	Ø
MITOCHONDRIEN					
Gesamt fett	1,51	1,68	$1,54 \pm 0,04$	+ 25	S
Phosphatid	0,84	0,98	$0,90 \pm 0,07$	+ 9	Ø
MIKROSOMEN					
Gesamt fett	2,70	3,14	$2,69 \pm 0,24$	+ 17	S
Phosphatid	1,46	1,66	$1,63 \pm 0,35$	+ 2	Ø

Versuch Nr. I B

Kontrollen: Mittelwert aus 9 Tieren

Nitrosamin (120; 60; 60 mg/kg): Mittelwert aus 15 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

2) Unterschied signifikant

S = deutlicher Unterschied

zum Mittelw. der Kontrollgruppe: (S) = geringgradig verändert

Ø = nicht verändert

Tabelle 6

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von N-Methyl-N-Nitrosourethan
 (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontrollen mg/mg N 1)	Nitrosamin mg/mg N	Mittelwert der Kontr.gruppe I $M \pm \sigma$	% Verän- derung gegenüb. M	2)
HOMOGENAT					
Gesamt fett	1,53	1,56	$1,52 \pm 0,18$	+ 18	Ø
Phosphatid	0,87	0,86	$0,73 \pm 0,12$	+ 18	Ø
MITOCHONDRIEN					
Gesamt fett	1,38	1,56	$1,34 \pm 0,04$	+ 16	S
Phosphatid	0,99	1,03	$0,90 \pm 0,07$	+ 14	(S)
MIKROSOMEN					
Gesamt fett	2,97	3,29	$2,69 \pm 0,24$	+ 22	S
Phosphatid	2,16	2,14	$1,63 \pm 0,35$	+ 31	S

Versuch Nr. I C

Kontrollen: Mittelwert aus 7 Tieren

Nitrosamin (20 - 30 ng/kg/die für 4 Wochen): Mittelw. aus 10 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

2) Unterschied signifikant zum

Mittelwert der Kontrollgruppe: S = deutlicher Unterschied

(S) = geringgradig verändert

Ø = nicht verändert

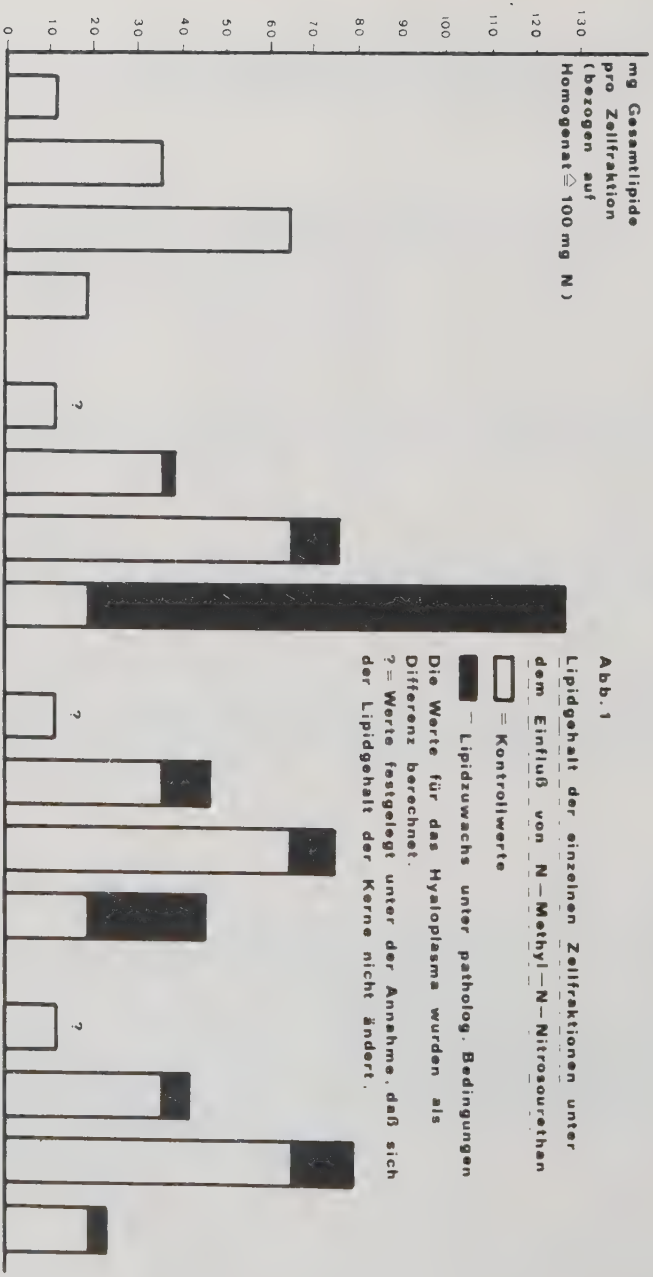


Abb. 1

Lipidgehalt der einzelnen Zellfraktionen unter dem Einfluß von N-Methyl-N-Nitrosourethan

□ = Kontrollwerte

■ = Lipidzuwachs unter patholog. Bedingungen

Die Werte für das Hyaloplasma wurden als Differenz berechnet.

? = Werte festgelegt unter der Annahme, daß sich der Lipidgehalt der Kerne nicht ändert.

Chlortetracyclin (Aureomycin) (Versuch II)

Besonders nach intravenöser Gabe von Chlortetracyclin sind beim Menschen - vorwiegend in der Schwangerschaft - Leberveränderungen mit Leberverfettung beschrieben worden (SCHULTZ et al., 1963; LEPPER et al, 1951; SBOROV and SUTHERLAND, 1951). Über die Häufigkeit solcher Veränderungen sind die Ansichten z.Z. noch widersprechend. Fettinfiltrationen der Leber konnten auch bei Versuchstieren nach Gabe von - allerdings außerordentlich hohen - Chlortetracyclin-Dosen beobachtet werden (SETO and LEPPER, 1954). Nach Applikation von Chlortetracyclin trat auch bei unseren Versuchen eine Leberverfettung ein (Tab. 7, Abb. 2). Die Menge der Gesamtlipide im Homogenat stieg auf das Doppelte an. Der Gesamtfettgehalt der Mitochondrien stieg unter diesen Bedingungen geringfügig an, während im Fettanteil der Mikrosomen keine nennenswerten Veränderungen zu beobachten waren. Damit ist die Fettansammlung bei dieser Art der Verfettung ganz überwiegend im Hyaloplasmaraum lokalisiert, wie die Berechnungen über die intracelluläre Verteilung zeigen (Abb. 2).

Tabelle 7

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von Chlortetracyclin
 (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontrollen mg/mg N 1)	Chlortetra- cyclin mg/mg N	Mittelwert der Kontr.gruppe I $M \pm \sigma$	% Verän- derung gegenüb. M	2)
HOMOGENAT					
Gesamt fett	1,40	2,76	$1,52 \pm 0,18$	+ 109	S
Phosphatid	0,76	0,66	$0,73 \pm 0,12$	- 10	Ø
MITOCHONDRIEN					
Gesamt fett	1,36	1,47	$1,34 \pm 0,04$	+ 10	(S)
Phosphatid	0,92	1,02	$0,90 \pm 0,07$	+ 13	(S)
MIKROSOMEN					
Gesamt fett	2,39	2,52	$2,69 \pm 0,24$	- 6	Ø
Phosphatid	1,44	1,54	$1,63 \pm 0,35$	- 5	Ø

Versuch Nr. II

Kontrollen: Mittelwert aus 7 Tieren

Chlortetracyclin (3 x 100 mg/kg): Mittelwert aus 13 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

2) Unterschied signifikant zum

Mittelwert der Kontrollgruppe: S = deutlicher Unterschied

(S) = geringgradig verändert

Ø = nicht verändert

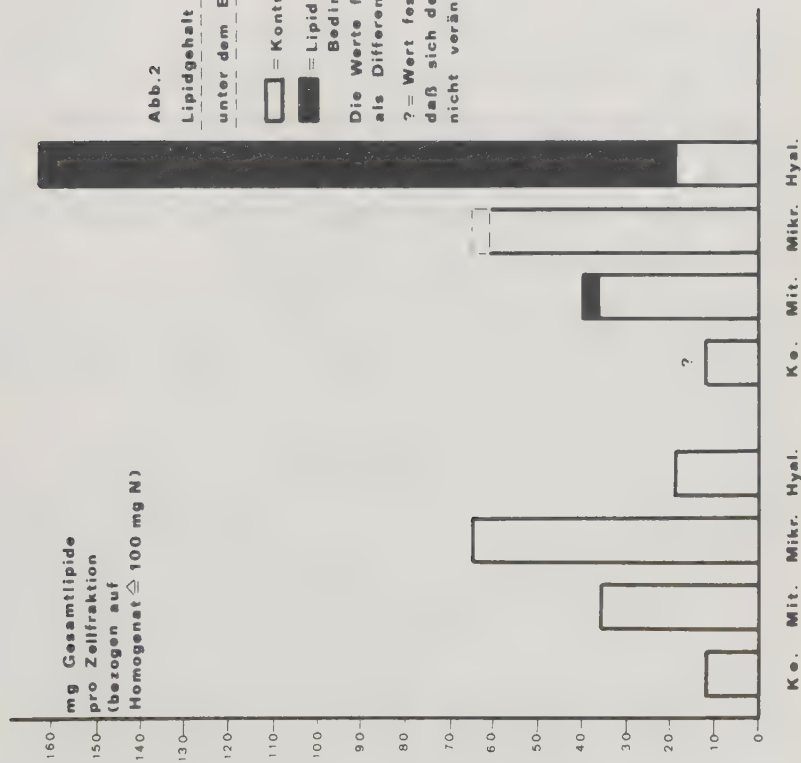


Abb. 2

Lipidgehalt der einzelnen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von Tetracyclin

□ = Kontrollwerte

■ = Lipidzuwachs unter patholog.
Bedingungen

Die Werte für das Hyaloplasma wurden
als Differenz berechnet.

? = Wert festgelegt unter der Annahme,
daß sich der Lipidgehalt der Kerne
nicht verändert.

Kontrollgruppe I

Versuch II

Chlortetracyclin (3 x 100 mg / kg)

6-Aminonicotinamid (Versuch III)

6-Aminonicotinamid wird nach Untersuchungen von HERKEN und Mitarbeitern (COPER und HERKEN, 1963; BRUNNEMANN, COPER und NEUBERT, 1963) in die Pyridinnucleotide NAD und besonders NADP an Stelle von Nicotinamid eingebaut. Es kommt dadurch zu ausgeprägten Veränderungen in Stoffwechsel und Funktion von Gehirn (COPER und HERKEN, 1963), Niere (HERKEN, SENFT und ZEMISCH, 1964 und 1966) und anderen Organen.

Die einmalige Applikation einer sehr hohen Dosis von 6-Aminonicotinamid (150 mg/kg) verursachte eine Leberverfettung (Tab. 8). Diese Dosis führt bei längerer Versuchsdauer als hier angewendet nach einigen Tagen in 100% der Fälle zum Tode. Der Gehalt an Gesamtfetten des Homogenats stieg nach 16 Std. an, desgleichen geringfügig der Lipid- und Phosphatidgehalt der Mitochondrien. Im Homogenat verminderte sich die Menge der Phosphatide. Der Fettgehalt der Mikrosomen änderte sich nicht signifikant. Die Abb. 3 zeigt, daß der Hauptanteil des Lipidzuwachses im Hyaloplasma liegt.

Tabelle 8

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von 6-Aminonicotinamid
 (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontrollen mg/mg N 1)	6-Amino- nicotinamid mg/mg N	Mittelwert der Kontr. Gruppe II $M \pm \sigma$	% Verän- derung gegenüb. II	2)
HOMOGENAT					
Gesamtfett	1,49	2,40	$1,60 \pm 0,29$	+ 50	S
Phosphatid	0,64	0,53	$0,72 \pm 0,11$	- 26	(S)
MITOCHONDRIEN					
Gesamtfett	2,14	2,35	$2,13 \pm 0,17$	+ 10	(S)
Phosphatid	1,26	1,41	$1,22 \pm 0,12$	+ 16	(S)
MIKROSOMEN					
Gesamtfett	3,34	3,15	$3,27 \pm 0,32$	- 4	Ø
Phosphatid	1,60	1,51	$1,72 \pm 0,24$	- 12	Ø

Versuch Nr. III

Kontrollen: Mittelwert aus 9 Tieren

6-Aminonicotinamid (150 mg/kg): Mittelwert aus 8 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

2) Unterschied signifikant zum

Mittelwert der Kontrollgruppe: S = deutlicher Unterschied

(S) = geringgradig verändert

Ø = nicht verändert

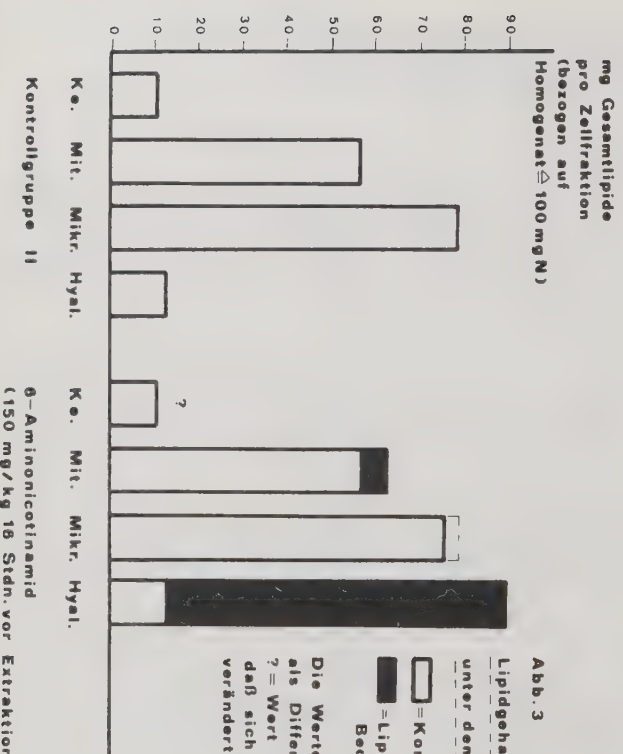


Abb. 3

Lipidgehalt der einzelnen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von 6-Aminonicotinamid

□ = Kontrollwerte
■ = Lipidzuwachs unter patholog.
Bedingungen

Die Werte für das Hyaloplasma wurden
als Differenz berechnet.
? = Wert festgelegt unter der Annahme,
daß sich der Lipidgehalt der Kerne nicht
verändert.

Phenyldiallylessigsäure-diäthylaminoäthanoester
(CFT 1201) (Versuch IV)

CFT 1201 ist als ein Hemmstoff Pharmaka abbauender, mikrosomaler Fermentsysteme bekannt geworden (NEUBERT und HERKEN, 1955). Neben dieser Wirkung besitzt die Substanz zweifellos eine Vielzahl anderer Hemmwirkungen. So fiel unter anderem eine Leberverfettung nach mehrfacher Gabe dieser Verbindung auf.

Bei der Präparation zeigten die Lebern der mit CFT 1201 behandelten Tiere eine Verfärbung; entsprechend mißfarben sahen die Fraktionen aus: das Homogenat - normalerweise hellrot - war schmutzigrün, die Mikrosomenfraktion - normalerweise weißrosa - dunkelbraunrot verfärbt. Diese Verfärbung ließ an einen erhöhten Gehalt an Gallenfarbstoffen denken. Möglicherweise greift die Substanz in den Ausscheidungsmechanismus des Bilirubins ein.

Nach Applikation von CFT 1201 (Tab. 9 - 11) traten massive Leberverfettungen auf. Die viermalige Gabe (Versuch IV A, Tab. 9) vermehrte den Gesamtfettgehalt des Homogenats um 80%. Die zusätzliche Applikation von 500 mg/kg am 5.Tag (Versuch IV B, Tab. 10)

ließ das Gesamtfett im Homogenat um 200% ansteigen. Auch in den beiden anderen Fraktionen (Tab. 10) war die Zunahme der Fette so stark, daß zwei Maximalwerte sämtlicher vorliegenden Ergebnisse erreicht wurden: eine Vermehrung des Gesamtfetts der Mitochondrien um 46% und des Phosphatidanteils um 35%.

Bei der chronischen Applikation (Versuch IV C) war die tägliche Dosierung niedriger (70 bzw. 150 mg/kg). Im Homogenat und in der Mitochondrienfraktion lag die Zunahme des Gesamtfetts unter den durch die hohen Dosierungen erreichten Werten; dagegen stellten in der Mikrosomenfraktion die Gesamtfetterhöhung um 62% und die Phosphatidzunahme um 115% Maximalwerte sämtlicher durch die vorliegenden Versuche erreichten mikrosomalen Verfettungen dar. Der Anteil der Phospholipide war auch in den beiden anderen Fraktionen erhöht.

Zusammenfassend zeigt Abb. 4 die intracelluläre Verteilung der Gesamtlipide unter den verschiedenen CFT-Dosierungen: Die größte Fetterhöhung liegt bei allen drei Versuchsserien im Hyaloplasma; vor allem in Versuch IV B. Aber auch die Mikrosomenfraktionen sind jedesmal, besonders in Versuch IV C, deutlich verfettet. Die Mitochondrienfraktion ist am stärksten in Versuch IV B von der Verfettung betroffen.

Tabelle 11

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von Phenylallylessigsäure-
diäthylaminoäthanolester (CFT 1201); (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontrollen mg/mg N 1)	CFT 1201 mg/mg N	Mittelwert der Kontr. Gruppe II $M \pm \sigma$	% Verän- derung gegenüb. M	2)
HOMOGENAT					
Gesamt fett	1,52	2,75	$1,60 \pm 0,29$	+ 72	S
Phosphatid	0,48	1,15	$0,72 \pm 0,11$	+ 60	S
MITOCHONDRIEN					
Gesamt fett	2,25	2,50	$2,13 \pm 0,17$	+ 17	S
Phosphatid	1,27	1,62	$1,22 \pm 0,12$	+ 33	S
MIKROSOMEN					
Gesamt fett	3,48	5,30	$3,27 \pm 0,32$	+ 62	S
Phosphatid	2,02	3,70	$1,72 \pm 0,24$	+ 115	S

Versuch Nr. IV C

Kontrollen: Mittelwert aus 9 Tieren

CFT 1201 (14 Tage): Mittelwert aus 14 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

2) Unterschied signifikant zum

Mittelwert der Kontrollgruppe: S = deutlicher Unterschied

(S) = geringgradig verändert

Ø = nicht verändert

mg Gesamtlipide
pro Zellfraktion
(bezogen auf
Homogenat $\triangleq$ 100 mg N)

Abb. 4

Lipidgehalt der einzelnen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von CFT 1201

□ = Kontrollwerte
■ = Lipidzuwachs unter patholog.
Bedingungen

Die Werte für das Hyaloplasmata wurden
als Differenz berechnet.
? = Werte festgelegt unter der Annahme,
daß sich der Lipidgehalt der Kerne nicht
verändert.

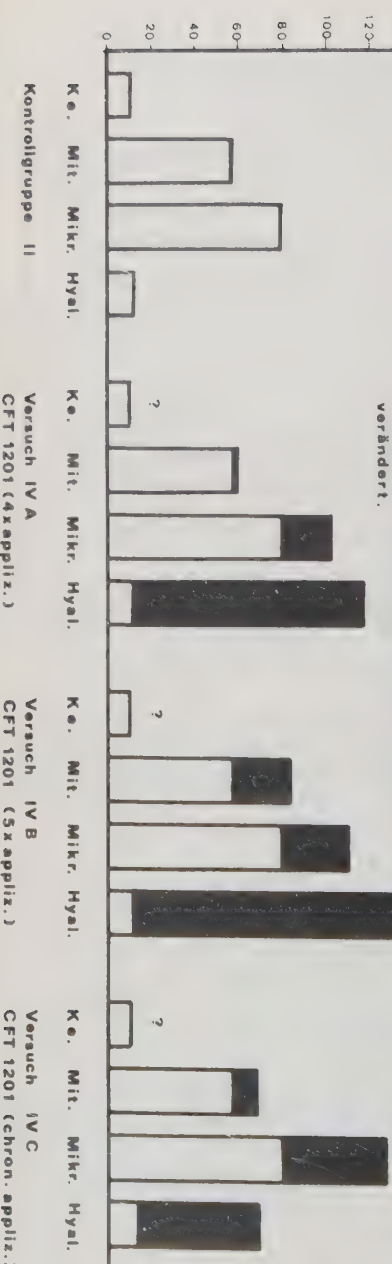


Tabelle 11

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von Phenyldiallylessigsäure-
diäthylaminoäthanolester (CFT 1201); (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontrollen mg/mg N 1)	CFT 1201 mg/mg N	Mittelwert der Kontr.gruppe II $M \pm \sigma$	% Verän- derung gegenüb. M	2)
HOMOGENAT					
Gesamt fett	1,52	2,75	$1,60 \pm 0,29$	+ 72	S
Phosphatid	0,48	1,15	$0,72 \pm 0,11$	+ 60	S
MITOCHONDRIEN					
Gesamt fett	2,25	2,50	$2,13 \pm 0,17$	+ 17	S
Phosphatid	1,27	1,62	$1,22 \pm 0,12$	+ 33	S
MIKROSOMEN					
Gesamt fett	3,48	5,30	$3,27 \pm 0,32$	+ 62	S
Phosphatid	2,02	3,70	$1,72 \pm 0,24$	+ 115	S

Versuch Nr. IV C

Kontrollen: Mittelwert aus 9 Tieren

CFT 1201 (14 Tage): Mittelwert aus 14 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

2) Unterschied signifikant zum

Mittelwert der Kontrollgruppe: S = deutlicher Unterschied

(S) = geringgradig verändert

Ø = nicht verändert

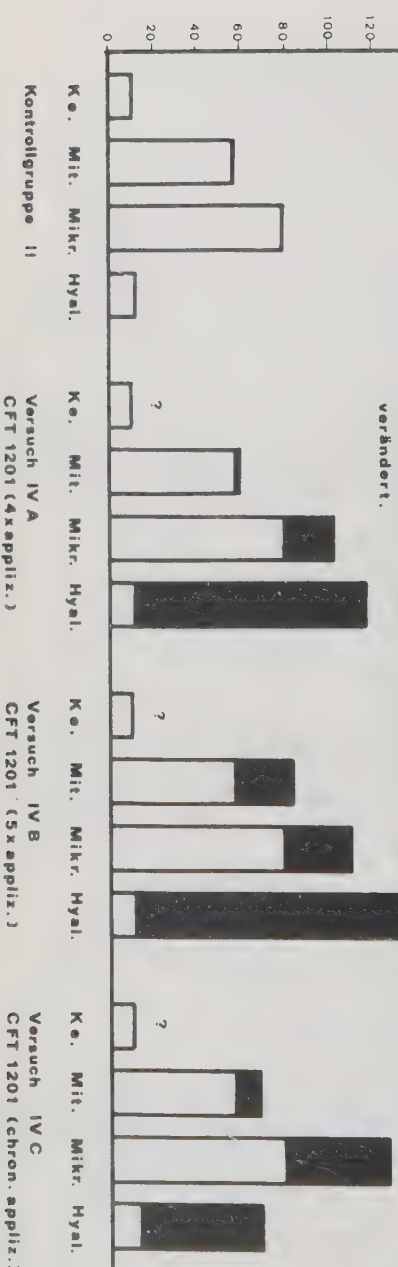
mg Gesamtlipide
pro Zellfraktion
(bezogen auf
Homogenat $\triangleq$ 100 mg N)

Abb. 4

Lipidgehalt der einzelnen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von CFT 1201

□ = Kontrollwerte
■ = Lipidzuwachs unter patholog.
Bedingungen

Die Werte für das Hyaloplasma wurden
als Differenz berechnet.
? = Werte festgelegt unter der Annahme,
daß sich der Lipidgehalt der Kerne nicht
verändert.



2,4-Dinitrophenol (Versuch V)

2,4-Dinitrophenol stellt eine typische "entkoppelnde" Substanz dar. Durch Entkopplung der Atmungskettenphosphorylierung greift sie in dramatischer Weise in den Energiehaushalt der Zelle ein.

Die chronische Zufuhr von Dinitrophenol veränderte den Fettgehalt der Lebern nicht signifikant (Tab.12). Die Gesamtlipide, jedoch nicht der Phosphatidanteil der Mikrosomenfraktion verminderten sich deutlich. Abb. 5 zeigt den ausgleichenden Anstieg der Gesamtlipide im Hyaloplasma.

Tabelle 12

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von 2,4-Dinitrophenol
 (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontrollen mg/mg N 1)	Dinitro- phenol mg/mg N	Mittelwert der Kontr.gruppe II $\bar{x} \pm \sigma$	% Verän- derung gegenüb. M	2)
HOMOGENAT					
Gesamt fett	1,72	1,50	$1,60 \pm 0,29$	- 6	Ø
Phosphatid	0,81	0,75	$0,72 \pm 0,11$	+ 4	Ø
MITOCHONDRIEN					
Gesamt fett	2,46	2,19	$2,13 \pm 0,17$	+ 3	Ø
Phosphatid	1,41	1,36	$1,32 \pm 0,12$	+ 12	Ø
MIKROSOMEN					
Gesamt fett	3,50	2,63	$3,27 \pm 0,52$	- 20	- S
Phosphatid	2,20	1,66	$1,72 \pm 0,24$	- 3	Ø

Versuch Nr. V

Kontrollen: Mittelwert aus 10 Tieren

2,4-Dinitrophenol (8 Tage): Mittelwert aus 13 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

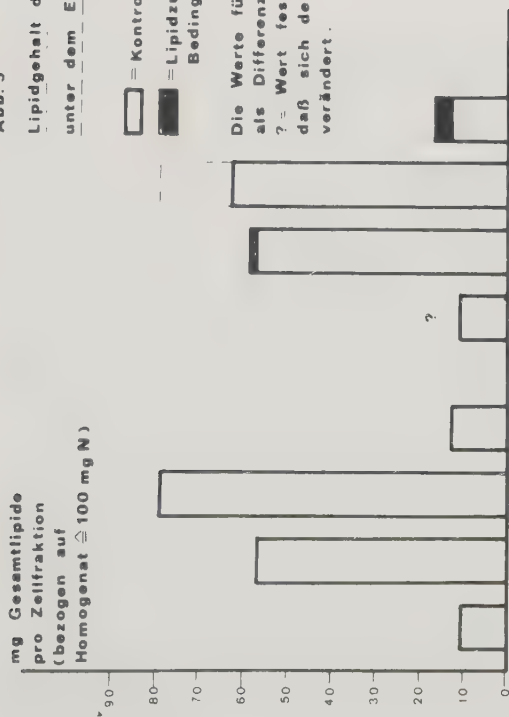
2) Unterschied signifikant zum

Mittelwert der Kontrollgruppe: S = deutlicher Unterschied

(S) = geringgradig verändert

Ø = nicht verändert

Abb. 5
 Lipidgehalt der einzelnen Zellfraktionen
 unter dem Einfluß von 2,4-Dinitrophenol



Die Werte für das Hyalo plasma wurden als Differenz berechnet.
 ? = Wert festgelegt unter der Annahme, daß sich der Lipidgehalt der Kerne nicht verändert.

Ke. Mit. Mikr. Hyal.
 Versuch V
 2,4-Dinitrophenol
 (8 x appliziert)

Kontrollgruppe II

Versuch VI: Fettinfusion (Intralipid 20%)

Die intravenöse Ernährung durch Fettemulsionen gewann während der letzten Jahre in der Klinik erheblich an Bedeutung. Die Vorteile dieser Infusionslösungen sind: Zufuhr größerer Kalorienmengen in relativ kleinem Flüssigkeitsvolumen ohne osmotische Eigenschaften. Es seien als Beispiele 2 Handelslösungen angeführt: Intralipid (10 oder 20% fraktioniertes Sojabohnenöl und 1,2% fraktioniertes Eigelblezithin in 2,5%iger Glycerinlösung; von Vitrum, Stockholm) und Lipofundin (5 - 6% Baumwollsaatöl in 1,5%iger Sorbitlösung; von Braun, Mellungen).

Über relativ toxische Bestandteile von Fettemulsionen liegen zahlreiche Untersuchungen vor. So sollen einige im Lipofundin enthaltene Triglyceride und Kepheline Thrombozytenabfall und Steigerung der Kapillarpermeabilität verursachen (WITTE et al., 1962; WITTE et al., 1964). Diese schädlichen Substanzen, nämlich niedermolekulare Triglyceride wie Triisovalerin, Tributyrin und Tricapronin (WRETLIND, 1957) und hydrierte Sojabohnenphosphatide als Emulgator für das Baumwollsaatöl sollen auch Ursache unerwünschter klinischer Nebenwirkungen wie stärkerer Anstieg

der Körpertemperatur und subjektiv empfundene Beschwerden sein (SCHUBERTH and WRETTLIND, 1961).

Innerhalb einer Testserie über Gemische aus Neutralfetten mit verschiedensten Emulgatoren wurde von SCHUBERTH und WRETTLIND (1961) lediglich das Intralipid als frei von schädlichen Nebenwirkungen gefunden. Aus diesem Grund wurde für die im folgenden beschriebenen Versuche nur Intralipid verwendet.

Die Dosierungen bei den eigenen Versuchen lagen z.T. extrem hoch. Während erwachsenen Menschen nicht mehr als 10 ml/kg Intralipid gegeben werden soll, betrug die niedrigste Dosis, die die Ratten erhielten, 45 ml/kg. Das entspricht der Zufuhr von 90 Cal/kg, etwa dem Grundumsatz der Ratte (TANNHAUSERS Lehrbuch des Stoffwechsels und der Stoffwechselkrankheiten). Die höchste Dosis, die den Ratten infundiert wurde, war 150 ml/kg, also 15mal höher als die für den Menschen angegebene Maximaldosis. Außerdem lag die Infusionsgeschwindigkeit, die für die Verträglichkeit der Emulsion zweifellos von Wichtigkeit ist, 10-20fach über der für den Menschen empfohlenen Tropfgeschwindigkeit von 0,04 ml/kg/min. Noch rascher infundierten allerdings SCHUBERTH und WRETTLIND (1961) in ihren Tierversuchen mit

1 ml/kg/min, d.h. mit einer 25fachen Geschwindigkeit.

Da sich die Dosis von 150 ml/kg für die Tiere als 100%ig letal erwies, war es zunächst notwendig, in Vorversuchen orientierende Angaben über die LD_{50} zu erhalten. Bei Überschreitung einer bestimmten Grenze während der Infusion, die bei ca. 80 ml/kg lag, trat bei einigen Tieren eine Haemolyse ein. Der Urin färbte sich zunächst intensiv gelb und wurde schließlich rot bis dunkelrot. Die eingetretene Haemolyse führte aber keineswegs zwangsläufig zum Tode des Tieres; andererseits starben auch Tiere, die keine Haemolyse bekommen hatten. Als Ursache der Haemolyse könnten Lysolecithine in Frage kommen, die sich nach SCHUBERTH und WRETLIND (1961) im Laufe längerer Lagerungszeiten bilden können. Die Tabelle 13 zeigt den Prozentsatz der Todesfälle innerhalb von 12 Stunden nach Infusion der angegebenen Mengen.

Es wurden zwei verschiedene Tierstämme verwendet; die grafische Auswertung der LD_{50} (Abb. 6) ergab bei Gruppe I etwa 100 ml/kg, bei Gruppe II einen niedrigeren Wert, nämlich etwa 80 ml/kg.

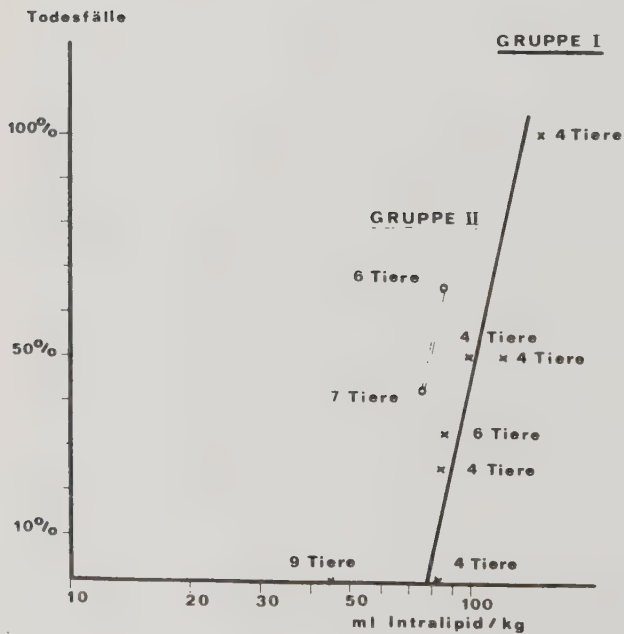
Tabelle 13

Prozentsatz der Todesfälle nach Infusion der
angegebenen Mengen Intralipid

ml Intralipid/kg	Todesfälle in den folg. 12 Stunden	Anzahl der Versuchs- tiere	Nr. der unten beschriebenen Versuche
<u>Gruppe I</u> ¹⁾			
150	100 %	4	
120	50 %	4	
100	50 %	4	
86	33 %	6	
85	25 %	4	
82	0 %	4	
45	0 %	9	Versuch VI A
<u>Gruppe II</u> ¹⁾			
85	66 %	6	
75	43 %	7	Versuch VI B

¹⁾ Es wurden zwei verschiedene Tierstämme verwendet.

Grafische Ermittlung der LD₅₀ nach Intralipid i.v.
(2 Tierkollektive)



Die vollständige Resorption des injizierten Fetts aus dem Blut benötigte mindestens 12 Stunden. Bei der Laparotomie zeigte sich nach Infusion größerer Dosen eine massiv verfettete Milz und Leber als Ergebnis der Fettspeicherung durch das retikuloendotheliale System.

Diese Beobachtung entspricht dem Befund von ELKES (1949), daß injiziertes Fett als Fremdkörper von den Kupfferschen Sternzellen phagozytiert wird. Chylomikronen dagegen gelangen aus den Lebersinusoiden in die pericellulären Räume und von dort aus durch Pinozytose in die Leberzellen (LANGDON and PHILLIPS, 1961). Sofern die Tiere die Infusion mehrere Tage überlebten, war eine Rückbildung der Verfärbung zu beobachten. Nach 3 bis 4 Tagen hatte die anfänglich kalkweiße Milz bis auf einige oberflächliche weiße Sprenkelungen ihre natürliche Farbe wiedererlangt. Die Leberverfettung hielt sich wesentlich länger. Es stellten sich allmählich eine Läppchenzeichnung und ein 2 mm breiter Fettsaum der großen Leberlappen ein.

Nach Injektion der relativ niedrigen Dosis von 45 ml/kg (Versuch VI A, Tab. 14) starb kein Tier (Tab. 13). Der Anstieg der Gesamtfette im

Homogenat war gering; in den Mitochondrien und Mikrosomen trat keine signifikante Veränderung des Fettgehalts ein.

Die Infusion der wesentlich höheren Dosis von 75 ml/kg (Versuch VI B, Tab. 15) führte zu einer massiven Leberverfettung; 43% der Tiere starben (Tab. 15).

Das Gesamtfett des Homogenats nahm um 280% zu. In den Mitochondrien wurde eine geringgradige Zunahme des Gesamtfettgehalts um 15% beobachtet. Die Menge des mikrosomalen Gesamtfetts vermehrte sich nicht. Erwartungsgemäß änderte sich der Phosphatidgehalt aller drei Fraktionen gegenüber den Kontrollwerten nicht, da der Leber durch die Injektion hauptsächlich Neutralfette zugeführt worden waren. Das aufgenommene Neutralfett bleibt also ganz überwiegend im Hyaloplasmaraum liegen (Abb. 7).

Tabelle 14

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen

unter dem Einfluß von Intralipid i.v. (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontrollen mg/mg N 1)	Intralipid mg/mg N	Mittelwert der Kontrollgr. II $M \pm \sigma$	% Verän- derung gegenüb. M	2)
HOMOGENAT					
Gesamt fett	1,75	2,41	$1,60 \pm 0,29$	+ 51	S
Phosphatid	0,86	0,77	$0,72 \pm 0,11$	+ 7	Ø
MITOCHONDRIEN					
Gesamt fett	2,00	2,15	$2,13 \pm 0,17$	+ 1	Ø
Phosphatid	1,20	1,40	$1,22 \pm 0,12$	+ 15	Ø
MIKROSOMEN					
Gesamt fett	3,27	2,97	$3,27 \pm 0,32$	- 9	Ø
Phosphatid	1,77	1,57	$1,72 \pm 0,24$	- 8	Ø

Versuch Nr. VI A

Kontrollen: Mittelwert aus 9 Tieren

Intralipid (45 ml/kg): Mittelwert aus 9 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

2) Unterschied signifikant zum

Mittelwert der Kontrollgruppe: S = deutlicher Unterschied

(S) = geringgradig verändert

Ø = nicht verändert

Tabelle 15

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von Intralipid i.v.
 (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontrollen mg/mg N 1)	Intralipid mg/mg N	Mittelwert der Kontrollgr. II $M \pm \sigma$	% Verän- derung gegenüb. M	2)
HOMOGENAT					
Gesamt fett	1,40	6,11	$1,60 \pm 0,29$	+ 282	S
Phosphatid	0,73	0,73	$0,72 \pm 0,11$	+ 1	Ø
MITOCHONDRIEN					
Gesamt fett	1,95	2,47	$2,13 \pm 0,17$	+ 16	S
Phosphatid	1,15	1,06	$1,22 \pm 0,12$	- 13	Ø
MIKROSOMEN					
Gesamt fett	2,91	2,94	$3,27 \pm 0,32$	- 10	Ø
Phosphatid	1,57	1,53	$1,72 \pm 0,24$	- 11	Ø

Versuch Nr. VI B

Kontrollen: Mittelwert aus 7 Tieren

Intralipid (75 ml/kg): Mittelwert aus 4 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

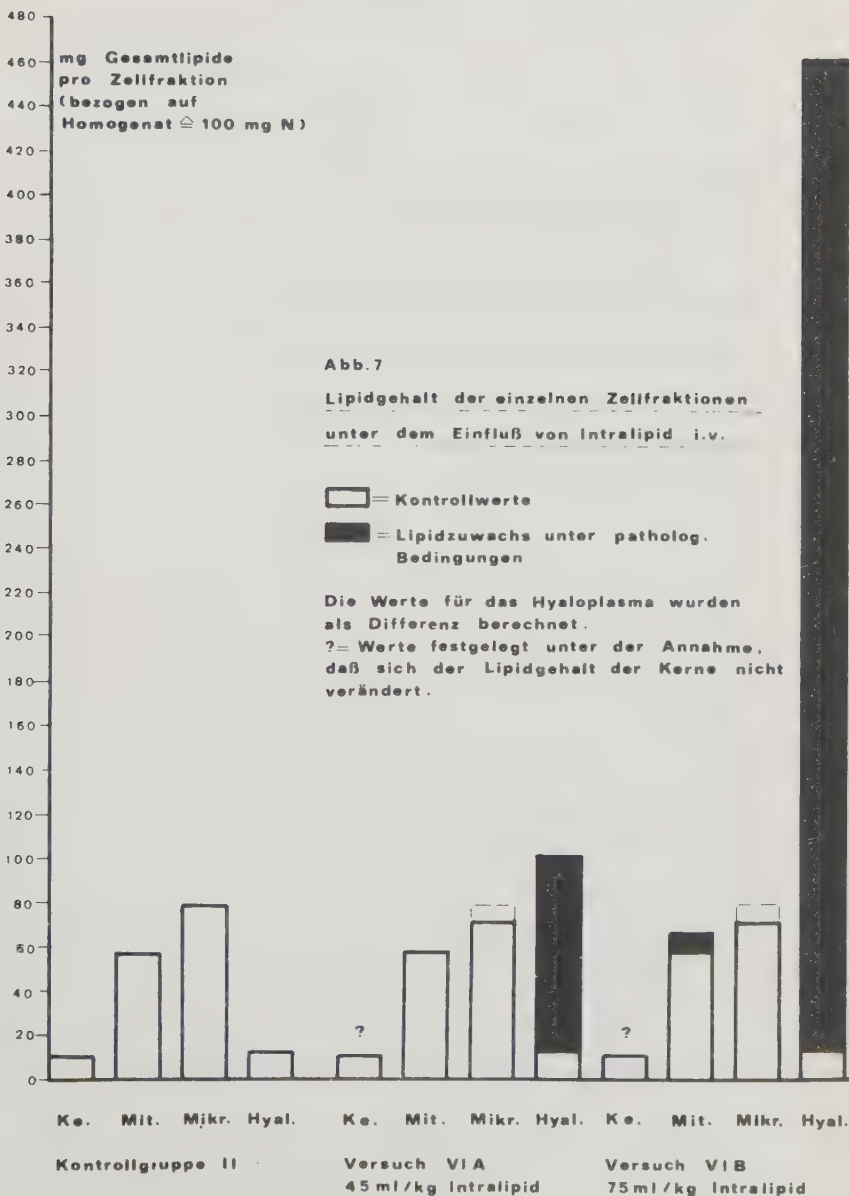
1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

2) Unterschied signifikant zum

Mittelwert der Kontrollgruppe: S = deutlicher Unterschied

(S) = geringgradig verändert

Ø = nicht verändert



Hunger und Fettinfusion (Versuch VII)

Es interessierte die Frage, ob ein vorhergehendes Fasten einen Einfluß auf die Fettverteilung ausübt. Unter Bedingungen des Hungers ist der Energiebedarf der Leberzellen sicher erheblich gesteigert. Zusätzlich ergibt sich auch das Problem, ob für die Fettoxydation ein gewisses Maß von Kohlenhydratverarbeitung notwendig ist.

Die 24stündige Nahrungskarenz (Versuch VII A, Tab. 16) bewirkte eine mäßige Zunahme der Fette im Homogenat, jedoch keine Veränderung in der Mitochondrienfraktion und in der Mikrosomenfraktion.

Den Tieren der Gruppe VII B (Tab 17) wurden innerhalb der Hungerperiode 81 ml/kg Intralipid zugeführt, also etwas mehr als bei dem zuletzt erwähnten Versuch VI B. Diese Dosis enthält ca. 180 Cal/kg und entspricht $\frac{2}{3}$ des Leistungsumsatzes einer Ratte. Es trat eine Vermehrung des Gesamtfettes im Homogenat um 200% ein. Sie lag damit unter dem Grad der Verfettung, der nach der niedrigeren Dosis von 75 ml/kg ohne gleichzeitiges Fasten der Tiere (Versuch VI B, Tab. 15) erreicht wurde. Die Lipidmenge der Mitochondrien stieg um 20% an; diese Zunahme entsprach

etwa der des Versuchs VI B. Die übrigen in Tab. 17 angegebenen Werte - besonders die der Mikrosomenfraktion - wichen nicht signifikant von den Kontrollen ab.

Die Abb. 8 der intracellulären Verteilung des Gesamtfetts zeigt ähnlich der Abb.7, daß die Lipide überwiegend im Hyaloplasmaraum liegen bleiben.

Übereinstimmend mit der Tab. 17 ist in Versuch VII B die signifikante Zunahme des Gesamtfetts in der Mitochondrienfraktion ersichtlich.

Tabelle 16

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
unter Nahrungskarenz (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontrollen mg/mg N 1)	Hunger mg/mg N	Mittelwert der Kontr.gruppe II $M \pm \sigma$	% Verän- derung gegenüb. M	2)
HOMOGENAT					
Gesamt fett	1,75	2,31	$1,60 \pm 0,29$	+ 44	S
Phosphatid	0,86	1,00	$0,72 \pm 0,11$	+ 39	S
MITOCHONDRIEN					
Gesamt fett	2,00	2,20	$2,13 \pm 0,17$	+ 3	Ø
Phosphatid	1,20	1,30	$1,22 \pm 0,12$	+ 7	Ø
MIKROSOMEN					
Gesamt fett	2,00	3,17	$3,27 \pm 0,32$	- 3	Ø
Phosphatid	1,20	1,55	$1,72 \pm 0,24$	- 10	Ø

Versuch Nr. VII A

Kontrollen = Kontrollen des Versuchs VI A

Hunger (24 Stdn.): Mittelwert aus 7 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

2) Unterschied signifikant zum

Mittelwert der Kontrollgruppe: S = deutlicher Unterschied
 (S) = geringgradig verändert
 Ø = nicht verändert

Tabelle 17

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von Intralipid i.v.
und gleichzeitiger oraler Nahrungskarenz
 (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontrollen mg/mg N 1)	Intralipid und Hunger mg/mg N	Mittelwert der Kontrollgr. II $M \pm \sigma$	% Verän- derung gegenüb. M	2)
HOMOGENAT					
Gesamtfett	1,75	4,88	$1,60 \pm 0,29$	+ 205	S
Phosphatid	0,86	0,88	$0,72 \pm 0,11$	+ 22	Ø
MITOCHONDRIEN					
Gesamtfett	2,00	2,58	$2,13 \pm 0,17$	+ 21	S
Phosphatid	1,20	1,42	$1,22 \pm 0,12$	+ 16	(S)
MIKROSOMEN					
Gesamtfett	3,27	3,42	$3,27 \pm 0,32$	+ 5	Ø
Phosphatid	1,77	1,67	$1,72 \pm 0,24$	- 3	Ø

Versuch Nr. VII B

Kontrollen = Kontrollen des Versuchs VI A

Hunger (24 Stdn.) und Intralipid (81 ml/kg): Mittelw. aus 6 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

2) Unterschied signifikant zum

Mittelwert der Kontrollgruppe: S = deutlicher Unterschied

(S) = geringgradig verändert

Ø = nicht verändert

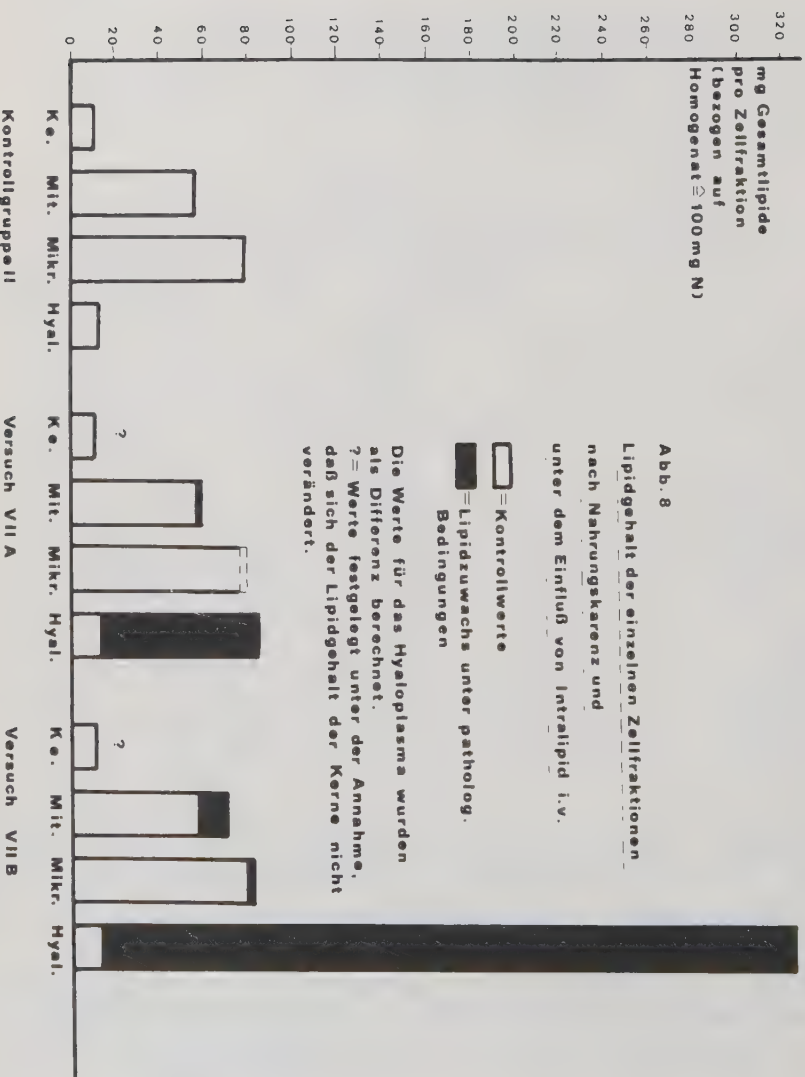


Abb. 8

Lipidgehalt der einzelnen Zellfraktionen
nach Nahrungskarenz und
unter dem Einfluß von Intrallipid i.v.

Penicillium rubrum (Versuch VIII)

Durch *Penicillium rubrum* gebildete Toxine sind nach Lagerung von feuchtem Getreide bekannt geworden und haben zu Vergiftungen von Menschen und Haustieren geführt. Im Vordergrund der Vergiftungen steht eine Leberschädigung:

Durch die Applikation von *Penicillium rubrum* entwickelte sich bei unseren Versuchen eine Leberverfettung. Der Gesamtfettgehalt des Homogenats nahm um 60% zu. Alle übrigen Werte lagen im Bereich der Kontrollen (Tab. 18). Die Verfettung betrifft also ausschließlich den Hyaloplasmaraum (Abb. 9).

Tabelle 18

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von Toxin aus Penicillium rubrum
 (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontrollen mg/mg N 1)	Penicillium rubrum mg/mg N	Mittelwert der Kontr.gruppe II $M \pm \sigma$	% Verän- derung gegenüb. M	2)
HOMOGENAT					
Gesamtfett	1,61	2,58	$1,60 \pm 0,29$	+ 61	S
Phosphatid	0,74	0,77	$0,72 \pm 0,11$	+ 7	Ø
MITOCHONDRIEN					
Gesamtfett	2,12	2,27	$2,13 \pm 0,17$	+ 7	Ø
Phosphatid	1,23	1,32	$1,22 \pm 0,12$	+ 8	Ø
MIKROSOMEN					
Gesamtfett	2,98	2,80	$3,27 \pm 0,32$	- 14	-(S)
Phosphatid	1,54	1,43	$1,72 \pm 0,24$	- 17	-(S)

Versuch Nr. VIII

Kontrollen: Mittelwert aus 7 Tieren

Toxin aus Penicillium rubrum (8; 12 mg/kg): Mittelw. aus 7 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

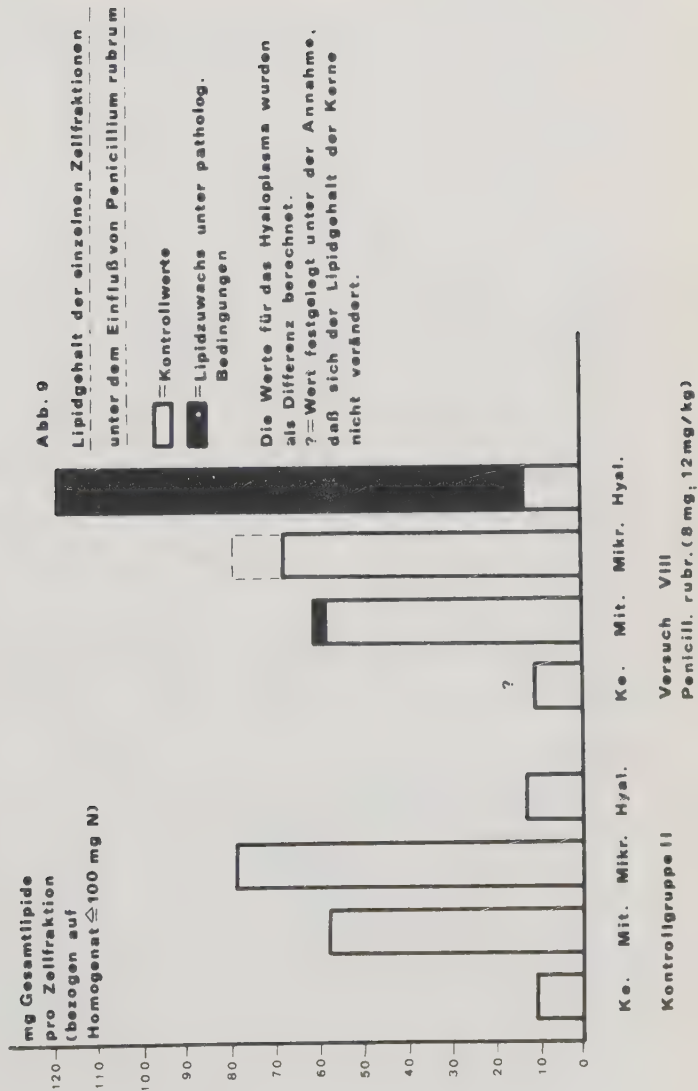
1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

2) Unterschied signifikant zum

Mittelwert der Kontrollgruppe: S = deutlicher Unterschied

(S) = geringgradig verändert

Ø = nicht verändert



Halothan (Versuch IX)

Nach Untersuchungen von SCHIMASSEK et al. (1965) verursacht die Inhalation von Halothan bei Mäusen eine Leberverfettung, die vor allem auf einem Anstieg der Neutralfette beruhen soll.

Auch unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen - chronische Inhalation von Halothan - wurde eine erhebliche Verfettung der Lebern bei Mäusen beobachtet (Tab. 19). Das Homogenat zeigte eine 200%ige Vermehrung des Gesamtfetts, zusätzlich auch eine geringe Zunahme der Phosphatide. Das Gesamtfett der Mikrosomen stieg deutlich an, dagegen nicht der Phosphatidanteil. In der Mitochondrienfraktion änderte sich der Lipidgehalt nicht.

Angaben über die intracelluläre Verteilung der Lipide unter dieser Versuchsserie können nicht gemacht werden, da die Leberzelle von Mäusen sicher nicht ohne weiteres einer Ratten-Leberzelle gleichgesetzt werden kann.

Tabelle 19

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
unter dem Einfluß von Halothan (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontrollen mg/mg N 1)	Halothan mg/mg N	% Veränderung gegenüber Kontrollen	2)
HOMOGENAT				
Gesamtfett	2,08	6,20	+ 198	"S"
Phosphatid	0,63	0,81	+ 29	"S"
MITOCHONDRIEN				
Gesamtfett	2,21	2,39	+ 8	Ø
Phosphatid	1,23	1,15	- 7	Ø
MIKROSOMEN				
Gesamtfett	3,12	4,11	+ 32	"S"
Phosphatid	1,42	1,36	- 4	Ø

Versuch Nr. IX

Kontrollen: Mittelwert aus 20 Tieren (Mäusen)

Halothan (1%ig): Mittelwert aus 19 Tieren (Mäusen)

Versuchsbedingungen s. Methodik

- 1) Kontrollen in dieser Versuchsserie
- 2) Ob eine signifikante Veränderung vorliegt, ist nicht mit Sicherheit anzugeben, da in Versuch IX Mäuse statt Ratten als Versuchstiere verwendet wurden.

Hepatektomie (Versuch X)

Nach 2/3 Hepatektomie kommt es bei Ratten im Laufe von zwei Wochen zu einer ausgeprägten Regeneration der Leber. Der Zeitpunkt der Untersuchung der verbliebenen Leberlappen nach einer 2/3 Hepatektomie erwies sich für die Bestimmung des Fettgehalts als ausschlaggebend. Die Tiere des Versuchs X A (Tab. 20) wurden 36 Stunden nach der Operation verwandt. Die verbliebenen Leberlappen erschienen massiv verfettet, wie auch Tabelle 20 zeigt. Das Gesamtfett stieg im Homogenat stark an; auch in den Mitochondrien nahm es deutlich - um 25% - zu. In der Mikrosomenfraktion veränderte es sich dagegen nicht. Der Gehalt an Phosphatiden änderte sich weder im Homogenat noch in den Mitochondrien; aber in den Mikrosomen sank er signifikant ab.

Abb. 10 veranschaulicht den massiven Gesamt-fettanstieg im Hyaloplasma. Die Veränderungen des Lipidgehalts in der Mitochondrienfraktion (Zunahme) und in der Mikrosomenfraktion (Abnahme) sind auch hier deutlich sichtbar.

Tabelle 20

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
nach 2/3 Hepatektomie (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontrollen mg/mg N 1)	Hepatek- tomie mg/mg N	Mittelwert der Kontrollgr. II M $\pm$ σ	% Verän- derung gegenüb. M	2)
HOMOGENAT					
Gesamt fett	2,17	7,07	1,60 $\pm$ 0,29	+ 342	S
Phosphatid	0,74	0,85	0,72 $\pm$ 0,11	+ 18	$\emptyset$
MITOCHONDRIEN					
Gesamt fett	2,07	2,68	2,13 $\pm$ 0,17	+ 26	S
Phosphatid	0,97	1,20	1,22 $\pm$ 0,12	- 2	$\emptyset$
MIKROSOMEN					
Gesamt fett	3,86	2,98	3,27 $\pm$ 0,32	- 9	$\emptyset$
Phosphatid	1,62	1,19	1,72 $\pm$ 0,24	- 31	-S

Versuch Nr. X A

Kontrollen: Mittelwert aus 5 Tieren

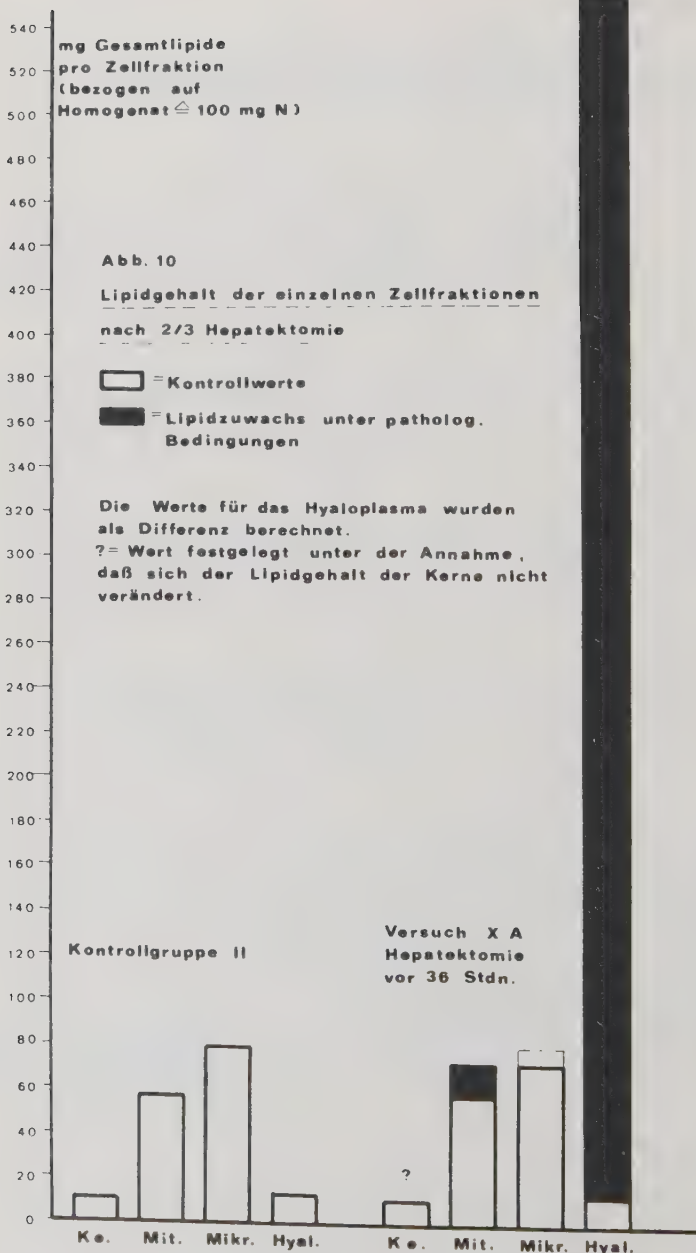
2/3 Hepatektomie (vor 36 Stdn.): Mittelwert aus 4 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

2) Unterschied signifikant zum

Mittelwert der Kontrollgruppe: S = deutlicher Unterschied
 (S) = geringgradig verändert
 $\emptyset$ = nicht verändert



Die Tiere des Versuchs X B wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach der Hepatektomie untersucht: die Gruppe B_1 nach 41 Stunden, die Gruppe B_2 nach 65 Stunden. Die Lebern der Gruppe B_1 (Tab. 21) enthielten eine ähnlich hohe Gesamtfettmenge im Homogenat wie die des Versuchs X A (Tab. 20). Die 24 Stunden später untersuchten Lebern der Gruppe B_2 (Tab. 22) wiesen einen deutlichen Rückgang der Verfettung auf: der hohe Anstieg um ca. 300% der Gruppe B_1 war um etwa die Hälfte abgesunken. Die Mitochondrien beider Gruppen zeigten eine deutliche Zunahme ihrer Gesamtfettmenge. Das Gesamtfett der Mikrosomen vermehrte sich nicht bzw. sank bei Gruppe B_2 (Tab. 22) ab, mit ihm auch der Phosphatidanteil.

Aus Abb. 11 ist wiederum die bevorzugte Fettablagerung im Hyaloplasmaraum ersichtlich, besonders bei Versuch X B_1 . Aber auch hier zeigt sich, wie in Versuch X A, daß die Mitochondrienfraktion von der Verfettung mitbetroffen ist.

Tabelle 21

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
nach 2/3 Hepatektomie (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontroll- gruppe III mg/mg N ¹⁾	Hepatektomie mg/mg N	% Veränderung gegenüber Kontrollgr.	2)
HOMOGENAT				
Gesamtfett	2,64	10,20	+ 288	"S"
Phosphatid	0,63	0,71	+ 13	"(S)"
MITOCHONDRIEN				
Gesamtfett	3,13	3,90	+ 25	"S"
Phosphatid	1,00	0,93	- 7	Ø
MIKROSOMEN				
Gesamtfett	5,36	5,40	+ 1	Ø
Phosphatid	1,29	1,19	- 8	Ø

Versuch Nr. X B₁

Kontrollen: Mittelwert aus 5 Tieren

2/3 Hepatektomie (vor 41 Stdn.): Mittelwert aus 9 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

2) Eine Signifikanz konnte bei diesem Versuch nicht bestimmt werden, da nur 1 Tierkollektiv als Kontrollgruppe vorliegt.

Tabelle 22

Lipidgehalt in den verschiedenen Zellfraktionen
nach 2/3 Hepatektomie (mg Lipid / mg Stickstoff)

	Kontroll- gruppe III mg/mg N ¹⁾	Hepatektomie mg/mg N	% Veränderung gegenüber Kontrollgr.	2)
HOMOGENAT				
Gesamtfett	2,64	5,23	+ 98	"S"
Phosphatid	0,63	0,73	+ 16	"(S)"
MITOCHONDRIEN				
Gesamtfett	3,13	4,06	+ 30	"S"
Phosphatid	1,00	1,06	+ 6	Ø
MIKROSOMEN				
Gesamtfett	5,36	4,39	- 18	-"S"
Phosphatid	1,29	0,96	- 26	-"S"

Versuch Nr. X B₂

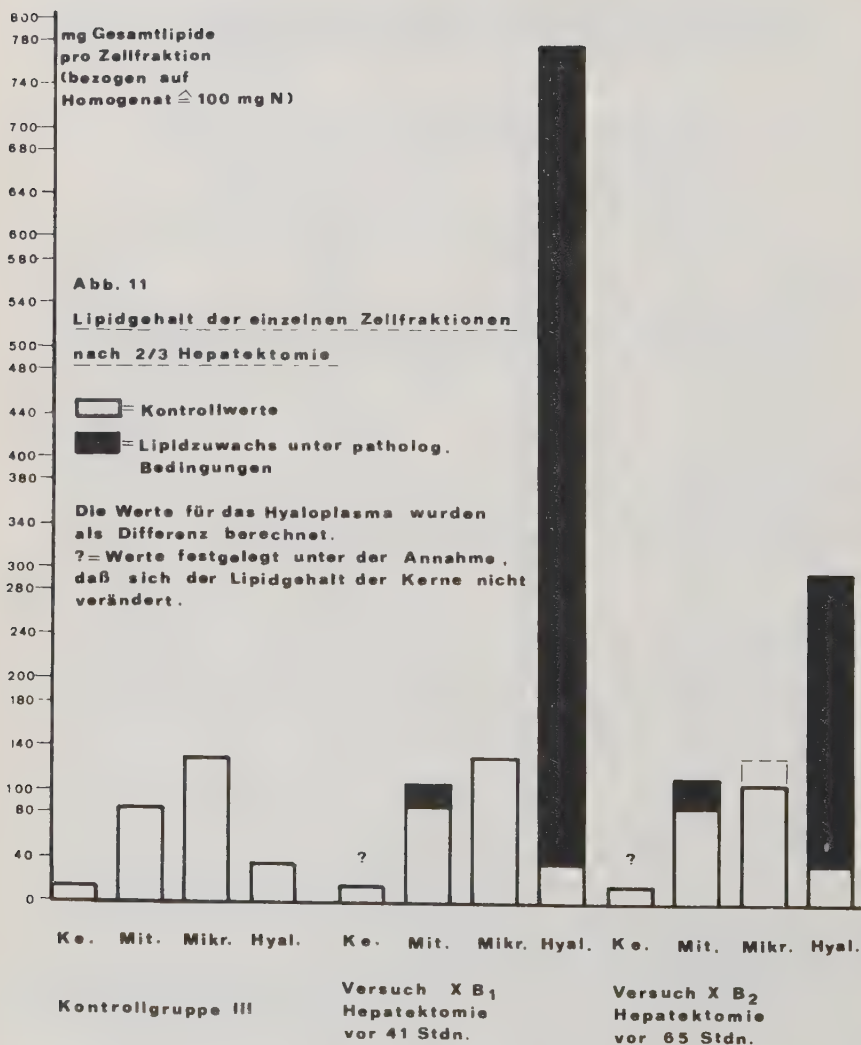
Kontrollen: Mittelwert aus 5 Tieren

2/3 Hepatektomie (vor 65 Std.): Mittelwert aus 7 Tieren

Versuchsbedingungen s. Methodik

1) Kontrollen in dieser Versuchsserie

2) Eine Signifikanz konnte bei diesem Versuch nicht bestimmt werden, da nur 1 Tierkollektiv als Kontrollgruppe vorliegt.



Eine zusammenfassende Darstellung aller
Ergebnisse ist in den Abbildungen 12 - 14
und der Tabelle 23 gegeben.

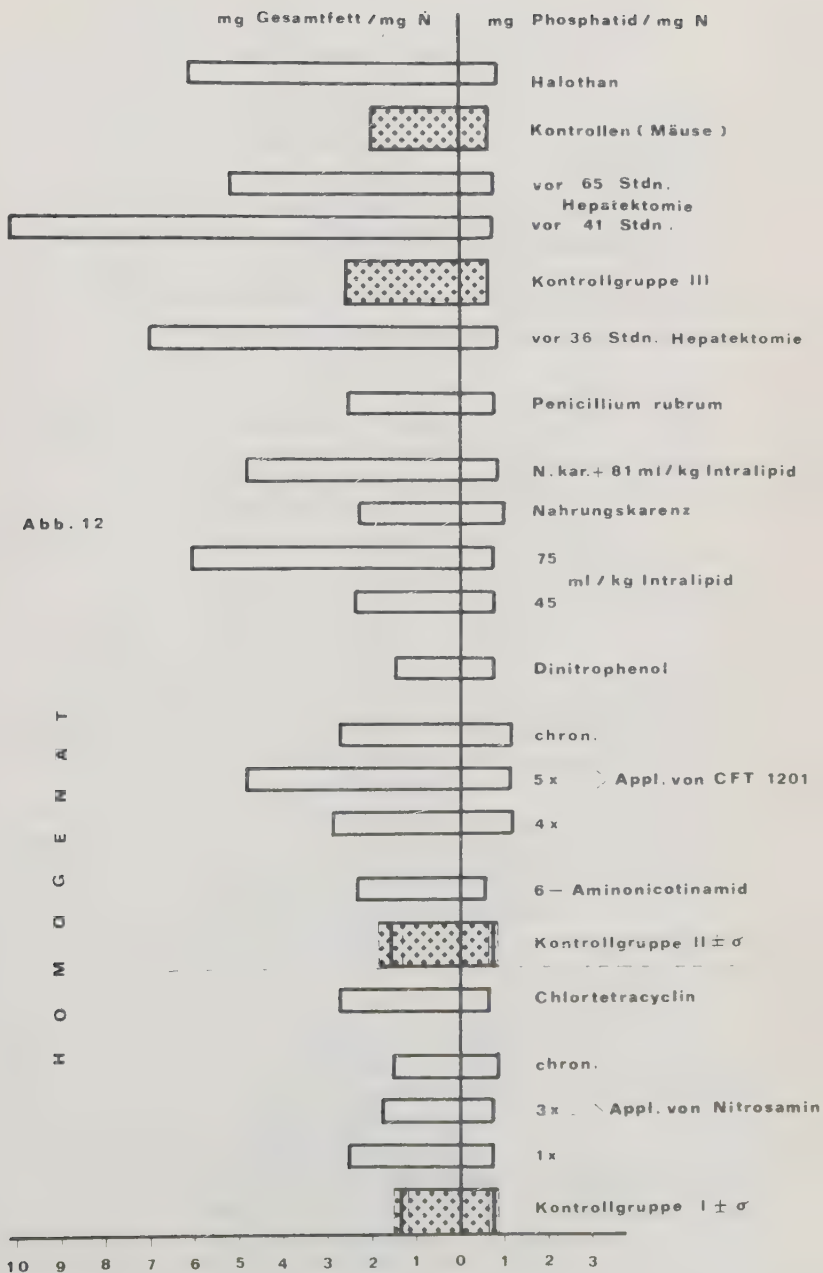
Tabelle 23

Übersicht über die Verfettungsgrade der einzelnen Zellfraktionen unter den verschiedenen Versuchsbedingungen

	Homogenat		Mitochondrien		Mikrosomen		Hyaloplasma
	Ges.-fette	Phosphat.	Ges.-fette	Phosphat.	Ges.-fette	Phosphat.	Gesamt-fette
<u>Nitrosamin</u>							
1 x	X X	Ø	(x)	Ø	X	Ø	X X
3 x	X	Ø	X	Ø	X	Ø	X X
chron.	Ø	Ø	X	(x)	X	X	(x)
<u>Chlor-tetracyclin</u>	X X	Ø	(x)	(x)	Ø	Ø	X X
<u>6-Amino-nicotinamid</u>	X X	-	(x)	(x)	Ø	Ø	X X
<u>CFT 1201</u>							
4 x	X X	X X	Ø	Ø	X	X X	X X
5 x	X X	X X	X	X	X	X X	X X
chron.	X X	X X	X	X	X X	X X	X X
<u>2,4-Dinitro-phenol</u>	Ø	Ø	Ø	Ø	-	Ø	X
<u>Intralipid</u>							
45 ml/kg	X X	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	X X
75 ml/kg	X X	Ø	X	Ø	Ø	Ø	X X
<u>Hunger</u>	X	X	Ø	Ø	Ø	Ø	X X
<u>Hunger und Intralipid</u>	X X	Ø	X	(x)	Ø	Ø	X X
<u>Penicillium rubrum</u>	X X	Ø	Ø	Ø	-	-	X X
<u>Haloethan (Mäuse)</u>	X X	X	Ø	Ø	X	Ø	?
<u>Hepatektomie</u>							
vor 36 Stdn.	X X	Ø	X	Ø	Ø	-	X X
vor 41 Stdn.	X X	(x)	X	Ø	Ø	Ø	X X
vor 65 Stdn.	X X	(x)	X	Ø	-	-	X X

X X : starke Veränderung (+ 50% und mehr)
 X : deutliche Veränderung (ca. + 20 bis + 50%)
 (x) : keine wesentliche Erhöhung (ca. + 5 bis + 20%)
 Ø : keine Veränderung
 - : Abnahme

Die Prozentangaben sind nur orientierend zu verstehen; die Veränderungen wurden in erster Linie nach der Signifikanz berechnet, soweit diese zur Verfügung steht.



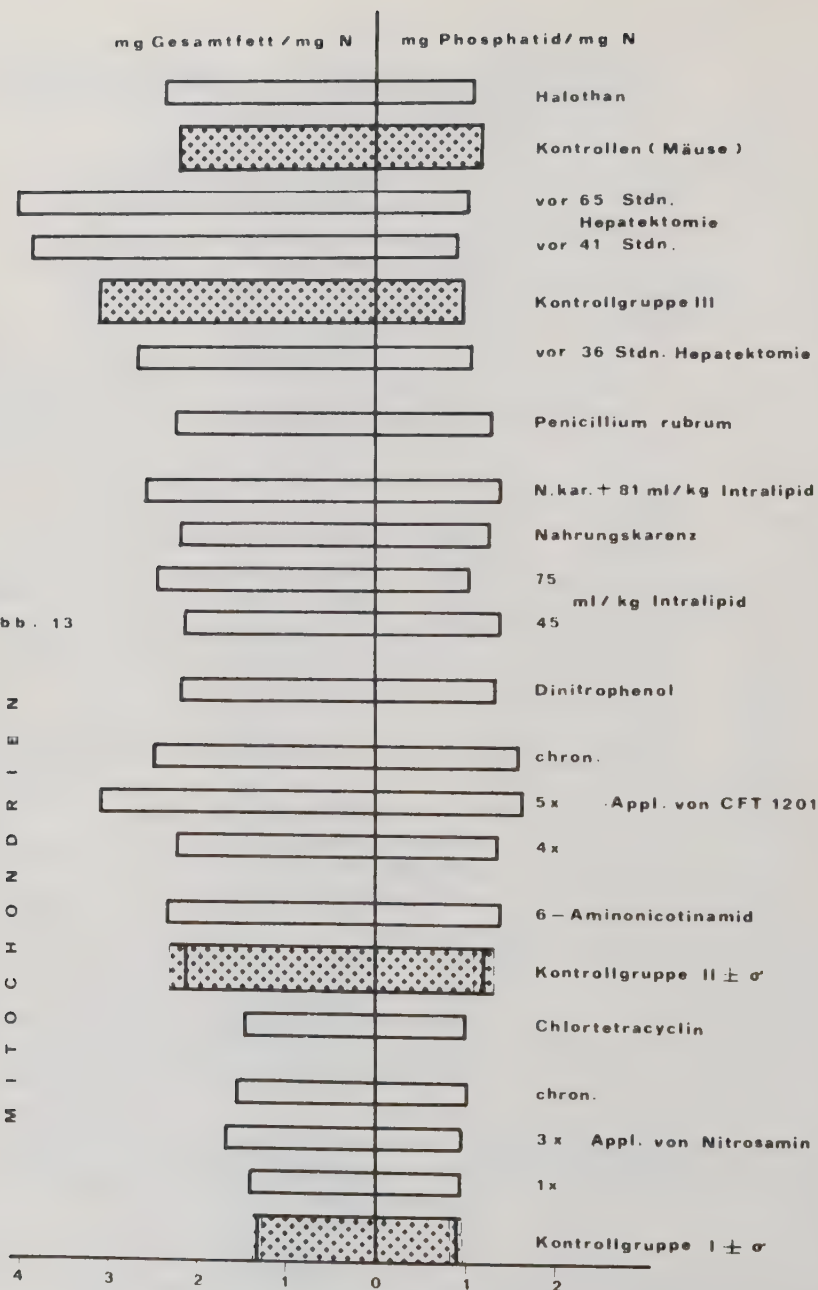
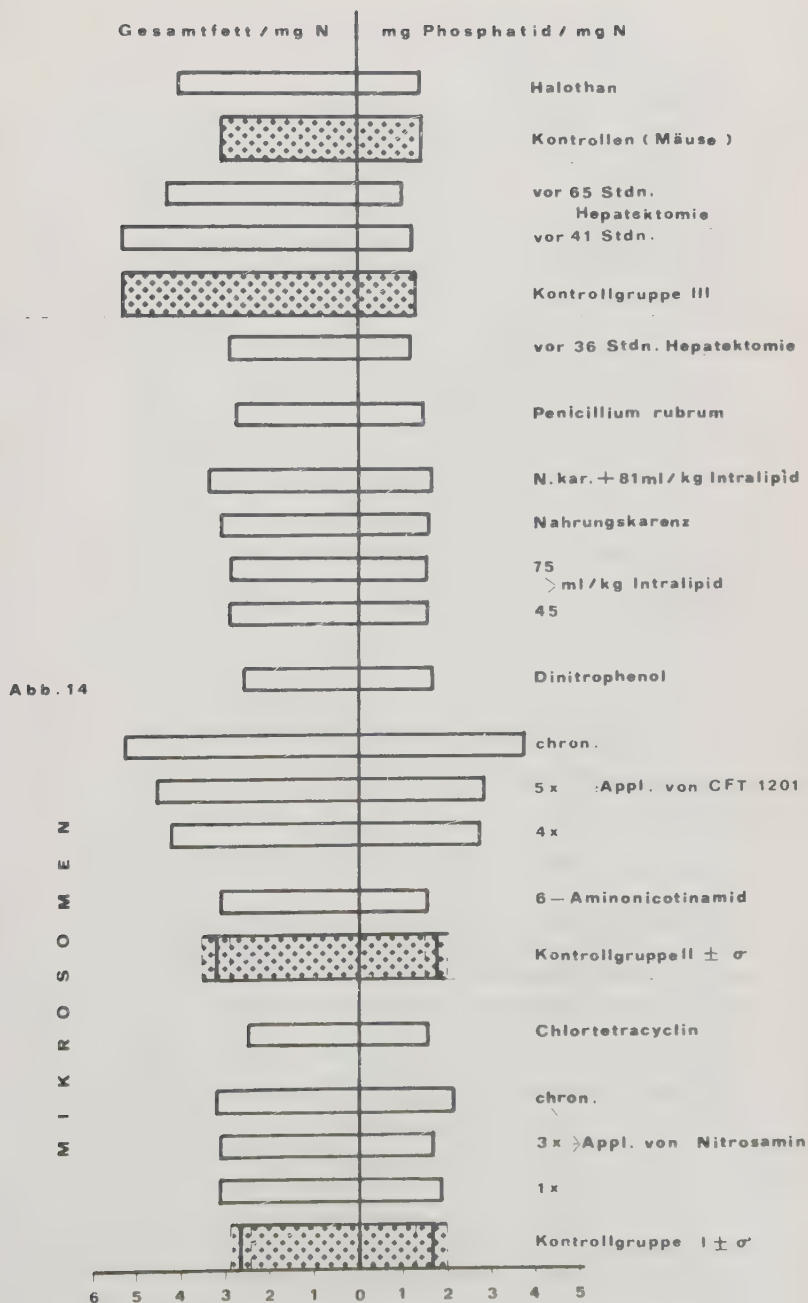


Abb. 13

M I T T E I L U N G



D i s k u s s i o n

=====

Bei einer "Leberverfettung" nehmen im allgemeinen die Triglyceride am stärksten zu, während der Gehalt an Phosphatiden relativ konstant bleibt. Dies wird auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt (Abb. 12). Im Organismus haben die einzelnen Lipide auch recht verschiedene Aufgaben. Die freien Fettsäuren und Triglyceride stellen die Transport- bzw. Speicherform energieliefernder Substrate dar, während die Phosphatide überwiegend als Bausteine von Zellstrukturen - besonders von Membranen - benutzt werden.

Das Fett der Leber entstammt:

1. dem Nahrungsfett (Chylomikronen);
2. mobilisiertem Depotfett, das die Leber dem Blutplasma in Form von freien Fettsäuren entnimmt;
3. eigener Synthese aus Kohlehydraten und Aminosäuren.

Die Leber baut diese Lipide in Plasmalipoproteide um, die im wesentlichen aus Proteinen, Triglyceriden, Phosphatiden, Cholesterin und Cholesterinestern bestehen (RAPOPORT, 1964). Nach neuerer Anschauung führt jede Störung der Syn-

these eines der Bausteine dieser Lipoproteide zu einer Hemmung der Sekretion und damit zum Aufstau von Lipiden in der Leberzelle (LOMBARDI, 1965).

Den Transport der zu sezernierenden Verbindungen innerhalb der Zelle und die Ausschleusung durch die Membran nach außen bewirkt wahrscheinlich das endoplasmatische Retikulum. Der Vorgang mag dem ähneln, den REDMAN, SIEKEVITZ und PALADE (1966) für die Pankreas-Amylase beschrieben haben. Da die Synthese der Proteinuntereinheiten an den Ribosomen der "rough-surfaced membranes" des endoplasmatischen Retikulums stattfindet, die Enzyme der Fettsäure-, Triglycerid-, Phosphatid- und Cholesterinsynthese ebenfalls teilweise an oder in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind (WILGRAM and KENNEDY, 1963; ABRAHAM et al., 1963; BREMER and GREENBERG, 1961), ist verständlich, daß eine Schädigung dieses Membransystems eine Störung der Lipidsekretion zur Folge haben kann und damit zur Leberverfettung führt.

Anhand der aufgezeigten Grundzüge kann eine Einteilung der untersuchten Schädigungen, die zur Leberverfettung führen, nach ihren möglichen Angriffspunkten versucht werden.

a. Schädigung des endoplasmatischen Retikulums
bzw. des Transportmechanismus

Aus Arbeiten von BÜCHNER et al. (1963) ist bekannt, daß Nitrosamin-Verbindungen das Ergastoplasma der Leberzelle zerstören, indem zunächst die parallele Organisation der Membranen verloren geht, sich dann Vesikel abschnüren, die schließlich zerfallen. Damit könnte eine Störung der Synthese und Sekretion von Lipoproteiden einhergehen. Ähnliche Wirkungen, die zur Schädigung des endoplasmatischen Retikulums und einer parallel auftretenden Verfettung führen, wurden auch bei anderen Cancergenen beobachtet, z.B. im Falle des Methyl-Dimethylaminoazobenzol (PORTER and BRUNI, 1959). Dies spricht dafür, daß das Ergastoplasma tatsächlich wesentlich an der Synthese der Plasmalipoproteide beteiligt ist.

Der zunächst überraschende Befund, daß die durch N-Methyl-N-Nitrosourethan hervorgerufene Verfettung im Homogenat nach einmaliger bzw. dreimaliger Gabe am stärksten ist und bei chronischer Applikation fast verschwindet (Versuch I, Tab. 4-6 und Abb. 1), deutet auf eine "Gewöhnung" hin. Nach den vorliegenden Ergebnissen kann nicht entschieden werden, ob dieser Gewöhnungseffekt etwa auf einer

Vermehrung der spezifischen abbauenden Enzyme beruht.

Ähnliche Schädigungen des endoplasmatischen Retikulums wurden elektronenmikroskopisch auch nach partieller Hepatektomie beobachtet (BÜCHNER, 1963). In der vorliegenden Arbeit (Versuch X, Tab. 20 - 22; Abb. 10 und 11) wurde der Fettgehalt des Homogenats 36, 41 und 65 Stunden nach $2/3$ Hepatektomie bestimmt. Es zeigte sich eine Zunahme fast ausschließlich des Neutralfetts, die nach 41 Stunden am ausgeprägtesten war und danach deutlich absank. Nach einer Hepatektomie sind grundsätzlich zwei Phasen der Regeneration registrierbar: Innerhalb der ersten schnellen Phase von 4 Tagen verdoppelt sich der verbliebene Leberrest, innerhalb der folgenden 14 - 21 Tage kommt es dann zu einer langsamen Wiederherstellung des ursprünglichen Lebergewichts (RAPOPORT). Nach den eigenen Befunden ist die anfängliche starke Verfettung nach fast 5 Tagen erheblich zurückgebildet (Abb. 12).

Bemerkenswert ist, daß die Mitochondrien anscheinend wesentlich länger den hohen Fettgehalt beibehalten als das Homogenat (Tab. 20 - 22). Nach 65 Stunden waren noch keine Anzeichen eines beginnenden Rückgangs zu beobachten.

Die Mikrosomen zeigten nach Hepatektomie nicht den geringsten Anstieg ihres Fettgehalts - im Gegensatz zu den Befunden, die nach Gabe von Nitrosamin erhoben werden konnten. Es kam vielmehr zu einer Verminderung des Lipidgehalts - möglicherweise ein Ausdrück der hochgradigen Schädigung des Ergastoplasmas.

b. Hemmung der Proteinsynthese

Halothan verursacht nach Untersuchungen von SCHIMASSEK, KUNZ und GALLWITZ (1965) bei Mäusen innerhalb von 3 Tagen eine Lebervergrößerung und starke -verfettung. Im Gegensatz dazu beobachtete OEHMIG (1964) trotz höherer Dosen keine Veränderungen an den Lebern weißer Mäuse. Möglicherweise spielt hier ein Gewöhnungseffekt eine Rolle, da OEHMIG die Tiere 4 Wochen lang mit Halothan behandelt hat. In der vorliegenden Arbeit (Versuch IX, Tab. 19) wurde nach fünftägiger Halothanapplikation im Homogenat eine starke Erhöhung des Fettgehalts gefunden. Weniger deutlich war sie in der Mikrosomenfraktion, gar nicht in der Mitochondrienfraktion zu beobachten. Übereinstimmend mit Angaben von SCHIMASSEK et al. (1965) beruht der Fettanstieg hauptsächlich auf Zunahme von Neutralfett.

Halothan ist Trifluorbromchloräthan, also eine halogenierte Kohlenwasserstoffverbindung. Nach SCHIMASSEK et al. (1966) verursacht der Hauptmetabolit, die

Trifluoressigsäure, keine Verfettung mehr. Die Verfettung wird wahrscheinlich durch ein intermediäres Radikal verursacht (SCHIMASSEK et al., 1966), womit eventuell ein dem Tetrachlorkohlenstoff ähnlicher Wirkungsmechanismus vermutet werden darf. Die Leberverfettung durch CCl_4 beruht auf einer Schädigung des endoplasmatischen Retikulums (NEUBERT und MAIBAUER, 1959; BASSI, 1960). Nach Untersuchungen von SEAKINS und ROBINSON (1963) sind speziell die Ribosomen betroffen. Danach scheint die eigentliche Ursache der Leberverfettung durch CCl_4 und möglicherweise auch durch Halothan in der Störung der Proteinsynthese zu liegen.

Auch das CFT 1201 hemmt die Protein-Biosynthese (NEUBERT und TIMMLER, 1960). Es könnte demnach neben dem weiter unten unter Gruppe d aufgezeigten Wirkungsmechanismus auch hier eingeordnet werden. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die mäßigen Verfettungen nach Chlortetracyclin (Versuch II, Tab. 7) und Toxin aus *Penicillium rubrum* (Versuch VIII, Tab. 18) ebenfalls Folge einer Hemmung der Proteinsynthese sind. Die Verdoppelung des Fettgehalts im Homogenat nach Applikation von Tetracyclin entspricht den Befunden von SETO und LEPPER (1954). Die bevorzugte Ablagerung von

Tetracyclin in den Mitochondrien lebender Zellen (DU BUY und SHOWACRE, 1961) hat nach den hier erhaltenen Befunden anscheinend wenig Einfluß auf den Fettgehalt der Mitochondrien (Tab. 18 u. Abb. 9).

c. Hemmung der Phosphatidsynthese

Es ist bekannt, daß alimentärer Mangel an Methyl-donatoren (Cholin und Methionin) zu einer Hemmung der Phosphatidsynthese führt und eine Leberverfettung hervorruft (LOMBARDI, 1965). Bei akuten Hungerzuständen kommt es zu einer massiven Fettmobilisation aus den Depots, der offensichtlich die Leber in ihrer synthetischen Leistung (der Bildung von Plasmalipoproteiden) nicht folgen kann. Hierfür ist wahrscheinlich der relative Mangel an C_1 -Bausteinen verantwortlich. Allerdings ist die in der vorliegenden Arbeit gefundene Fetterhöhung im Homogenat nach 24stündigem Hunger minimal und in der Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion gar nicht nachweisbar (Versuch VII A, Tab. 16). Es ist bereits seit längerer Zeit bekannt, daß nach Hunger nur bei einigen Tierspezies (z.B. Mäusen - SCHLICHT, 1955) ausgeprägte Verfettungen auftreten, während bei anderen Tierarten (z.B. Ratten) ein solcher Effekt vermißt wird.

Auch bei der Infusion großer Neutralfettmengen (Versuch VI A und B, Tab. 14 und 15) kommt es möglicherweise zu einem relativen Defizit, wobei der Mangel an Methylendonatoren und die Überforderung der Proteinsynthese-Reaktionen im Vordergrund stehen dürften. Der massive Fettgehalt des Homogenats in Versuch VI B (Tab. 15) besteht ausschließlich aus Neutralfett.

Erwartungsgemäß erzeugte die Fettinfusion während der Hungerperiode (Versuch VII B, Tab. 17) eine stärkere "Leberverfettung" als die einfache Nahrungskarenz ohne zusätzliche Maßnahmen (Versuch VII A, Tab. 16). Hier scheint sich der relative Mangel an Proteinbausteinen und Methylendonatoren noch stärker auszuwirken. Die Zunahme an Gesamtfetten im Homogenat ist weniger stark ausgeprägt als die Erhöhung, die bei annähernd gleicher Infusionsmenge ohne Fasten der Tiere erreicht wurde (Versuch VI B, Tab. 15). Möglicherweise ist die unter Nahrungskarenz erhöhte Fettoxydation die Ursache.

d. Hemmung der Cholesterinsynthese

Die Phenyllessigsäurederivate (SKF 525-A, SKF 3301-A, CFT 1201) hemmen eine große Anzahl von Reaktionen. Der Wirkungsmechanismus dieser

Inhibitionen ist nur in wenigen Fällen bekannt; die Verbindungen scheinen verschiedene Angriffspunkte zu haben. So hemmt z.B. CFT 1201 den Arzneimittelabbau (NEUBERT und HERKEN, 1955) und die Procainesterase durch kompetitive Hemmung (NETTER, 1959). SKF 525-A (Diäthylaminoäthyl-diphenyl-propylessigsäure) hemmt nach Untersuchungen von HOLMES und BENTZ (1960) die Cholesterinsynthese, indem es die Umwandlung der Mevalonsäure blockiert. Gleichzeitig besteht nach Befunden von RICE und GREENBERG (1960) ein erniedrigter Serumcholesterinspiegel bei Verfettung der Leber. Dieses Ergebnis entspricht allerdings nicht den bereits 1958 erhobenen Befunden (MAIBAUER, NEUBERT und ROTTKA), wonach eine Reihe von Phenylelessigsäurederivaten - einschließlich CFT 1201 - keine wesentliche Wirkung auf den Cholesteringehalt der Leber besitzen. Eine von ROGERS, DIXON und FOUTS (1963) gefundene Erhöhung des Gesamtlipidgehalts der Leber nach chronischer Applikation von SKF 525-A entspricht dem von MAIBAUER, NEUBERT und ROTTKA (1958) mit CFT 1201 erhobenen Befund. Die Lipiderhöhung nach CFT 1201 betrifft - wie bereits von NEUBERT und HOFFMEISTER (1960) beschrieben - auch die Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionen in hohem Maße.

Auch in den vorliegenden Untersuchungen wurden starke Fetterhöhungen in allen 3 untersuchten Fraktionen gefunden (Versuche IV A, B und C, Abb. 4), an denen mit auffallend hohem Anteil die Phosphatide beteiligt sind. Nach chronischer Applikation (Versuch IV C) übertrifft der Phosphatidgehalt in den Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionen deutlich den Neutralfettanteil. Zusätzlich spielt wahrscheinlich auch die Hemmung der Proteinsynthese durch CFT 1201 eine Rolle, wie schon oben unter Punkt b angedeutet wurde. Der stärkste Verfettungseffekt wurde in allen 3 untersuchten Fraktionen nach fünfmaliger Gabe hoher Dosen von CFT 1201 erreicht (Abb. 4); die chronische Applikation scheint eine "Gewöhnung" hervorzurufen.

Den unter den Punkten a - d vermuteten Hemmmechanismen der Sekretion von Plasmalipoproteiden könnte natürlich nur dann weiter nachgegangen werden, wenn in allen Fällen ein erniedrigter Plasmalipoproteidspiegel gefunden würde. Es wäre demnach notwendig, die jeweilige Menge der Plasmalipoproteide zu bestimmen, um etwas sicherere Vermutungen äußern zu können.

e. Hemmung des Energiestoffwechsels (ATP-Synthese)

Der Fetterhöhung durch 6-Aminonicotinamid (Versuch III, Tab. 8 und Abb. 3) liegen möglicherweise komplexere, noch nicht näher definierbare Ursachen zugrunde. Das Vergiftungsbild nach Gabe von 6-Aminonicotinamid besteht aus charakteristischen Lähmungen, die an den hinteren Extremitäten der Tiere beginnen und unaufhaltsam aufsteigen (COPER und HERKEN, 1963). Die toxische Wirkung der Verbindung beruht offensichtlich auf einem Einbau des Antimetaboliten in NAD(P). Auch in der Leber wird nach Untersuchungen von BRUNNEMANN, COPER und NEUBERT (1964) ein erheblicher Teil des Nicotinamids im NADP durch 6-Aminonicotinamid ersetzt. Damit wird möglicherweise - besonders bei den in dieser Arbeit verwandten sehr hohen Dosen von 6-Aminonicotinamid - ein erheblicher Teil NADP-abhängiger Stoffwechselschritte erschwert. Ob darauf ursächlich die Fettzunahme zurückgeführt werden kann, muß zunächst dahingestellt bleiben, da der Einfluß von 6-ANADP auf Reaktionen des Fettstoffwechsels noch nicht untersucht ist. Es könnte weiterhin daran gedacht werden, daß das 6-Aminonicotinamid die ATP-Bildung durch oxydative Phosphorylierung hemmt. ATP-Mangel scheint nach Befunden von FARBER, LOMBARDI und CASTILLO (1963) die Ursache der Leberverfettung

nach einem anderen Lebergift, nämlich Äthionin zu sein. Es erscheint allerdings sehr fraglich, ob auch für das 6-Aminonicotinamid ein ATP-Mangel als Verfettung auslösend diskutiert werden kann, da BRUNNEMANN, COPER und NEUBERT (1964) keine Schädigung der oxydativen Phosphorylierung nachweisen konnten.

2,4-Dinitrophenol ist von allen in dieser Arbeit benutzten Verbindungen die einzige, bei der ein eindeutiger Eingriff in den Energiestoffwechsel der Zelle - durch Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung - angenommen werden kann. 2,4-Dinitrophenol (Versuch V, Abb. 5) erzeugte jedoch als einziges der hier untersuchten Pharmaka keine Leberverfettung, sondern in allen 3 Fraktionen eher eine Abnahme des Fettgehalts. Seine Wirkung ist jedoch wahrscheinlich komplex, da bei der Störung der Energieverwertung sicher auch eine erhöhte Oxydation von Fettsäuren auftritt. 2,4-Dinitrophenol ist als toxisches Abmagerungsmittel bekannt (RAPOPORT). In unseren Versuchen zeigten die Versuchstiere während der achttägigen Applikation einen Gewichtsstillstand (S. 8). Interessant ist ein Vergleich mit der Wirkungsweise des Äthionins, bei dem eine Störung des

ATP-Stoffwechsels für die Leberverfettung verantwortlich gemacht wird. Offenbar sind jedoch die Verhältnisse komplizierter, als ursprünglich von FARBER et al. (1963) angenommen wurde. Es wäre wünschenswert, die Wirkung anderer "Entkopplungstoffe" auf den Fettstoffwechsel der Leber zu untersuchen.

f. Lipiderhöhung in der Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion

Wie NEUBERT und HOFFMEISTER (1960) durch Applikation von CFT 1201 und seltener Erden nachgewiesen haben, befindet sich das überschüssige Leberfett bei einer Verfettung nicht ausschließlich im Hyaloplasma der Zellen, sondern auch in Mitochondrien und Mikrosomen. Der Überblick über alle Versuche (Tab. 23, Abb. 12-14) bestätigt dies für das CFT 1201, aber auch für N-Methyl-N-Nitrosourethan, Fettinfusion, 2/3 Hepatektomie und Halothan. Allerdings wurde unter den vorliegenden Versuchsbedingungen im Vergleich zum möglichen Fettanstieg im Homogenat bzw. Hyaloplasma nur eine wesentlich geringere "Verfettung" (= Zunahme des Gehalts an Gesamtlipiden und Phosphatiden) der Mitochondrien und Mikrosomen beobachtet: Der höchsten Vermehrung um 400% im Homogenat stehen nur ca. 50% in der Mitochondrien-, aber immerhin

doch 100% in der Mikrosomenfraktion gegenüber. Offenbar bestehen keine Beziehungen zwischen Fettgehalt des Homogenats, der Mitochondrien und der Mikrosomen, z.B. etwa in dem Sinne, daß besonders viel Fett im Hyaloplasma auch zwangsläufig das Fett der Mitochondrien und Mikrosomen erhöhe. Auch Mitochondrien und Mikrosomen reagieren anscheinend unabhängig voneinander. Diese Befunde sprechen einerseits für einen selektiven Angriff der einzelnen Noxen, andererseits für die Stabilität des Membransystems gegenüber einfacher Fettinfiltration aus dem Hyaloplasma. Erhöhungen des Lipidgehalts in Mitochondrien und Mikrosomen sind denkbar durch Schädigung der Membranen durch das verabfolgte Pharmakon mit nachfolgender Fetteinlagerung oder aber durch aktive Stoffwechselvorgänge innerhalb dieser Zellorganellen.

Die Befunde dieser Arbeit bestätigen und ergänzen die früher geäußerte Vermutung, daß sich hinter dem Begriff "Leberverfettung" ein recht komplexer Vorgang verbirgt, bei dem unter den verschiedenen Bedingungen bereits morphologisch eine verschiedenartige Anhäufung von Lipiden vorliegt. So erscheint selbst das morphologisch so monotone Bild einer Verfettung noch recht unklar und schwer überschaubar, und es wird noch vieler weiterer

Untersuchungen bedürfen, um zu einer befriedigenden Analyse des pathologischen Bildes einer "Leberverfettung" zu gelangen.

Z u s a m m e n f a s s u n g
=====

(s. auch Tab. 23 und die Abb. 12 - 14)

1. Es war die Aufgabe dieser Arbeit, die intracelluläre Verteilung von Lipiden unter Einwirkung einiger Pharmaka zu untersuchen.
2. In der Literatur bisher noch nicht beschriebene "Leberverfettungen" (= Gesamtlipid-erhöhung im Homogenat) wurden gefunden nach Applikation von
 - a) 6-Aminonicotinamid,
 - b) N-Methyl-N-Nitrosourethan,
 - c) Toxin aus *Penicillium rubrum*.
3. Es wurden in jedem Versuch der Fettgehalt des Homogenats, der Mitochondrien- und der Mikrosomenfraktion untersucht; der Lipidgehalt des Hyaloplasmaraums wurde errechnet.
4. Die untersuchten Zellfraktionen ändern ihren Fettgehalt unabhängig voneinander.
5. Das Hyaloplasma wies bei allen durchgeführten Versuchen einen erhöhten Lipidgehalt auf. Dies war auch der Fall unter der Einwirkung von 2,4-Dinitrophenol, obwohl hier keine Fetterhöhung im Homogenat nachzuweisen war (erklärbar durch die mikrosomale Lipidabnahme). Die einzige Ausnahme wurde

nach chronischer Applikation von N-Methyl-N-Nitrosourethan beobachtet: In dieser Versuchsreihe war zwar der Lipidgehalt in den Mitochondrien und Mikrosomen erhöht, es konnte jedoch keine signifikante Erhöhung im Homogenat nachgewiesen werden. Die Tatsache, daß diese Lebern cirrhotisch verändert waren, mag zusätzlich eine gewisse Rolle spielen.

Von allen untersuchten Fraktionen wies das Hyaloplasma die eindrucksvollsten Erhöhungen auf.

6. Auch Mitochondrien können "verfetten". Schon beschrieben ist diese Tatsache nach Applikation von CFT 1201 und den seltenen Erden: die eigenen Versuche zeigen signifikante Gesamtfettererhöhungen in der Mitochondrienfraktion nach Applikation von N-Methyl-N-Nitrosourethan, Fettinfusion, 2/3 Hepatektomie und ebenfalls nach Verabreichung von CFT 1201.
7. Auch in Mikrosomen kann der Gehalt an Gesamtlipiden erhöht sein (bereits bekannt ebenfalls nach Applikation von CFT 1201 und den seltenen Erden).

In der vorliegenden Arbeit wurde dies für CFT 1201 bestätigt und auch nach Applikation von N-Methyl-N-Nitrosourethan und Halothan gefunden.

8. Auch wenn im Homogenat eine erhebliche Erhöhung des Gesamtlipidgehalts gemessen wird, bleibt der Phosphatidgehalt auffallend konstant (Abb. 12), oder er nimmt allenfalls gering zu wie nach Halothan oder unter Nahrungskarenz.
9. Auch in der Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion kann die Konzentration an Phosphatiden ansteigen (Bestätigung des schon beschriebenen Effekts nach Gabe von CFT 1201).
10. Nach chronischer Applikation eines Pharmakons scheint eine "Verfettung" von Mitochondrien und Mikrosomen eher einzutreten als nach kurzzeitiger Einwirkung (s. unter N-Methyl-N-Nitrosourethan und CFT 1201).

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S
=====

1. ABRAHAM, S.; K. J. MATTHES and
I. C. CHAIKOFF
The role of microsomes in fatty acid
synthesis from acetate by cell-free
preparations of rat liver and mammary
gland.
Biochem. et Biophys. Acta 70, 357 (1963)
2. ARTOM, C. and W. H. FISHMAN
The relation of the diet to the com-
position of tissue phospholipids.
I. The normal composition of liver and
muscle of the rat.
J. biol. Chem. 148, 405 (1943)
3. BASSI, M.
Electron microscopy of rat liver after
carbon tetrachloride poisoning
Exptl. Cell Res. 20, 313 (1960)
4. BERENBLUM, I. and E. CHAIN
Studies on the colorimetric determina-
tion of phosphate.
Biochem. J. 32, 286 (1938)
5. BREMER, J. and D. M. GREENBERG
Methyl transferring enzyme system of
microsomes in the biosynthesis of
lecithin
Biochem. et Biophys. acta 46, 205 (1961)
6. BRUNNEMANN, A.; H. COPER und D. NEUBERT
Biosynthese und Wirkung des
6-Aminonicotinamid-adenindinucleotids
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.
Pharm. 246, 437 (1964)
7. BÜCHNER, F.; W. OEHLERT und H. NOLTENIUS
Desoxyribonukleinsäure, Ribonukleinsäure
und Protein bei der Regeneration und
Kancerisierung im Experiment
Dtsch. med. Wschr. 88, 2277 (1963)

8. DU BUY, H.G. and J. L. SHOWACRE
Selective localization of tetracycline
in mitochondria of living cells
Science 133, 196 (1961)
9. COPER, H. und H. HERKEN
Schädigung des Zentralnervensystems
durch Antimetaboliten des Nikotin-
säureamids
Dtsch. med. Wschr. 42, 2025 (1963)
10. DRUCKREY, H.; D. SCHMÄHL; W. DISCHLER
und A. SCHILDBACH
Quantitative Analyse der experimen-
tellen Krebserzeugung
Naturwissenschaften 49, 217 (1962)
11. ELKES, J.
Triglyceride fats in human nutrition;
use of fat in parenteral nutrition;
preparation and properties of some
emulsions intended for use in intra-
venous alimentation
Brit. J. Nutr., 3, 367 (1949)
12. FARBER, E.; B. LOMBARDI and A.E. CASTILLO
The prevention by adenosine triphos-
phate of the fatty liver induced by
ethionine
Laboratory Investigation 12, 9, 873
(1963)
13. FOLCH, J.; M. LEES and G.H. SLOANE
STANLEY
A simple method for the isolation and
purification of total lipides from
animal tissues
J. Biol. Chem. 226, 497 (1957)
14. HARTMANN, F. u. U. FLECK
Vergleichende chemische und histolo-
gische Analysen der Leberverfettung
Klin. Wschr. 30, 652 (1952)

15. HERKEN, H.; G. SENFT und B. ZEMISCH

Die Einschränkung des tubulären Natrium- und Kaliumtransportes durch Biosynthese 6-Aminonicotinsäureamid enthaltender Nucleotide

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharm. 249, 54 (1964)

Der Einfluß von 6-Aminonicotinamid auf die Verteilung der Natrium- u. Kaliumionen zwischen dem extra- und intracellulären Raum in der Leber und der Skelettmuskulatur

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharm. 253, 364 (1966)

16. HOEHNE, R.

Untersuchungen über den Gehalt an oxydiertem und reduziertem Diphosphopyridinnucleotid (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid) in verschiedenen Zellfraktionen

Inaugural-Diss., Freie Universität Berlin, Medizin. Fak. (1966)

17. HOLMES, W.L. and J. D. BENTZ

Inhibition of cholesterol biosynthesis in vitro by SKF 525-A

J. Biol. Chem. 235, 3118 (1960)

18. KENNEDY, E.P.

Biosynthesis of phospholipides

Fed. Proc. 16, 3 (1957)

19. LANGDON, R. G. and A. H. PHILLIPS

Lipid metabolism

Ann. Rev. Biochem. 30, 189 (1961)

20. LEPPER, M. H.; C. K. WOLFE; H.J. ZIMMERMANN;
E. R. CALDWELL; H. W. SPIES and H. F. DOWLING

Effect of large doses of aureomycin on human liver

Arch. Int. Med. 88, 271 (1951)

21. LETTERER, E.
Allgemeine Pathologie
Stuttgart, Thieme (1959)
22. LOMBARDI, B.
Pathogenesis of fatty liver
Fed. Proc. Symposia 25, 5, 1200 (1965)
23. MAIBAUER, D.; D. NEUBERT und
H. ROTTKA
Pharmakologische Untersuchungen bei der
experimentellen Leberverfettung
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.
Pharm. 234, 474 (1958)
24. NETTER, K. J.
Die Hemmung der Procainhydrolyse durch
die Diäthylaminoäthanolester der Diphe-
nylpropylelessigsäure (SKF 525-A) und
der Diphenylelessigsäure ("Trasentin")
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.
Pharm. 235, 498 (1959)
25. NEUBERT, D. und H. HERKEN
Wirkungssteigerung von Schlafmitteln
durch den Phenylallylessigsäureester
des Diäthylaminoäthanol
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.
Pharm. 225, 453 (1955)
26. NEUBERT, D. und I. HOFFMEISTER
Intracelluläre Lokalisation von Fett-
substanzen bei experimenteller Leber-
verfettung
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.
Pharm. 237, 519 (1960)
27. NEUBERT, D. und D. MAIBAUER
Vergleichende Untersuchungen der oxyda-
tiven Leistungen von Mitochondrien und
Mikrosomen bei experimenteller Leber-
schädigung
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.
Pharm. 235, 291 (1959)

28. NEUBERT, D. und R. TIMMLER

Einfluß einiger Phenylelessigsäurederivate
(CFT 1201, SKF 525-A) auf den Einbau von
1-C 14 - d 1 - Alanin in Mikrosomenproteine
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.
Pharm. 238, 358 (1960)

29. OEHMIG, H.

Bestehen bei einer Halothannarkose Bedenken
im Hinblick auf die Leberfunktion?
Dtsch. med. Wschr. 89, 132 (1964)

30. PORTER, K. R. and C. BRUNI

An electron microscope study of the early
effects of 3'-Me-DAB on rat liver cells
Cancer Res. 19, 997 (1959)

31. POTTER, U. R. and C. A. ELVEHJEM

A modified method for the study of tissue
oxidations
J. Biol. Chem. 144, 495 (1936)

32. RAPOPORT, S. M.

Medizinische Biochemie
2. Auflage, Berlin 64

33. REDMAN, D. M.; P. SIEKEVITZ and G.E. PALADE

Synthetises and transfer of amylase in
pigeon pancreatic microsomes
J. Biol. Chem. 241, 1150 (1960)

34. RICE, E. G. and S. M. GREENBERG

Effects of β -Diethylaminoethyl diphenyl-
propylacetate hydrochloride (SKF 525-A)
on biosynthesis and distribution of
cholesterol in the rat
Fed. Proc. 19, 15 (1960)

35. ROGERS, L.A.; B. L. DIXON and J.R. FOUTS

Effects of SKF 525-A on hepatic glycogen
and rate of hepatic drug metabolism
Biochem. Pharm. 12, 341 (1963)

36. SBOROV, V. M. and D. A. SUTHERLAND
Fatty liver following aureomycin
and terramycin therapy in chronic
hepatic disease
Gastroenterology 18, 598 (1951)
37. SCHIMASSEK, H.; J. HELMS; W. KUNZ
und A. STIER
Lebervergrößerung unter Trifluor-
essigsäure, Spaltprodukt des Halothan
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.
Pharm. 255, 67 (1966)
38. SCHIMASSEK H.; W. KUNZ und H. J.
GALLWITZ
Differenzierung des Leberstoffwechsels
unter Halothan
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.
Pharm. 251, 195 (1965)
39. SCHLICHT, I.
Experimentelle Untersuchungen über den
Ablauf der Leberverfettung bei Hunger
und Sauerstoffmangel
Virchows Archiv 326, 568, (1955)
40. SCHUBERTH, O. and A. WRETLIND
Intravenous infusions of fat emulsions,
phosphatides and emulsifying agents
Acta Chir. Scand. 1961, Suppl. 278
41. SCHULTZ, J. C.; J. S. ADAMSON;
W. W. WORKMAN and T. D. NORMAN
Fatal liver disease after intravenous
administration of tetracycline in high
dosage
New Engl. J. Med. 269, 999 (1963)
42. SEAKINS, A. and D. S. ROBINSON
The effect of the administration of
carbon tetrachloride on the formation
of plasmalipoproteins in the rat
Biochem. J. 86, 401 (1963)

43. SETO, J. T. and M. H. LEPPER
Effect of chlortetracycline, oxytetracycline
and tetracycline administered intravenously
on hepatic fat content: quantitative method
of study including failure of some vitamins
and other drugs to migrate effect
Antibiotics a. Chemother. 4, 666 (1954)
44. TANNHAUSER
Lehrbuch des Stoffwechsels und der
Stoffwechselkrankheiten
Thieme-Verlag, 1957
45. WILGRAM, G. F. and E. P. KENNEDY
Intracellular distribution of some enzymes
catalyzing reactions in the biosynthesis
of complex lipids
J. Biol. Chem. 238, 2615 (1963)
46. WITTE, S.; D. BRESSEL; K. Th. SCHRICKER und
M. SCHÖN
Über den Einfluß eines intravenös injizier-
baren Fettpräparates auf die Blutgerinnung
Klin. Wschr. 40, 459 (1962)
47. WITTE, S.; H. SCHÖN; D. BRESSEL; K. Th.
SCHRICKER und W. ZELLER
Beziehungen zwischen Blutlipiden und
Gerinnungsveränderungen nach Phosphatid-
und Triglyceridinfusionen
Klin. Wschr. 42, 149 (1964)
48. WRETLIND, A.
Effect of tributyrin on circulation and
respiration
Acta Physiol. Scand. 40, 59 (1957)
49. WRETLIND, A.
The toxicity of low-molecular triglycerides
Acta Physiol. Scand. 40, 338 (1957)

Herrn Professor Herken danke ich für
die Überlassung des Themas dieser Arbeit
und für die freundliche Unterstützung
während der zwei Jahre, die ich an seinem
Institut arbeiten durfte.

Lebenslauf

Am 21. Oktober 1941 wurde ich als zweites Kind des Diplom-Handelslehrers und Studienrats Bernhard Neke und seiner Ehefrau Herta geb. Gaertner in Berlin geboren. Von 1948 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Niederdünzsbach bei Eschwege, ab 1952 das Realgymnasium für Mädchen in Eschwege, an dem ich am 22. März 1960 die Reifeprüfung ablegte.

Nach einem zweisemestrigen Latein- und Biologiestudium in Göttingen begann ich dort 1961 mit dem Studium der Medizin. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im Oktober 1963. Seit 1964 war ich an der Freien Universität Berlin immatrikuliert. In den folgenden zwei Jahren arbeitete ich am Pharmakologischen Institut der Freien Universität an der vorliegenden Dissertation. Am 21. März 1967 bestand ich die ärztliche Prüfung.

Seit dem Mai 1967 bin ich als Medizinalassistentin im Städtischen Behring-Krankenhaus tätig.

